



THÈSE

Pour l'obtention du grade de DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE POITIERS UFR de médecine et de pharmacie Modèles de cellules souches malignes et thérapeutiques (Diplôme National - Arrêté du 7 août 2006)

École doctorale : Biologie-santé - Bio-santé (Limoges) Secteur de recherche : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

> Présentée par : Sara Basbous

La voie Rho/ROCK, un nouveau mécanisme d'échappement des cellules leucémiques au contrôle de l'immunité T innée

Directeur(s) de Thèse : Jean-Marc Gombert, André Herbelin

Soutenue le 13 juillet 2016 devant le jury

Turv	
Jury	•

Président	Marc Paccalin	Professeur des Universités, Université de Poitiers
Rapporteur	Marie-Thérèse Rubio	Praticien hospitalier, Vandoeuvre-lès-Nancy
Rapporteur	Jean-Pierre Couty	Maître de conférences, Institut Cochin
Membre	Jean-Marc Gombert	Professeur des Universités, Université de Poitiers
Membre	André Herbelin	Directeur de recherche INSERM, CHU de Poitiers
Membre	Julie Dechanet-Merville	Directeur de recherche, Université de Bordeaux

Pour citer cette thèse :

Sara Basbous. *La voie Rho/ROCK, un nouveau mécanisme d'échappement des cellules leucémiques au contrôle de l'immunité T innée* [En ligne]. Thèse Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie. Poitiers : Université de Poitiers, 2016. Disponible sur Internet http://theses.univ-poitiers.fr

Université de Poitiers

Ecole Doctorale : Biosanté N°524

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS

Secteur de Recherche : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Présentée par :

Sara BASBOUS

Le 13 juillet 2016

La voie Rho/ROCK, un nouveau mécanisme d'échappement des cellules leucémiques au contrôle de l'immunité T innée

Directeurs de Thèse :

Jean Marc GOMBERT

André HERBELIN

<u>JURY</u>

Marc Paccalin	Président du jury	Professeur, CHU de Poitiers
Marie-Thérèse Rubio	Rapporteur	Docteur, CHU de Nancy
Jean-Pierre Couty	Rapporteur	Professeur, Inserm 1016, Institut Cochin
Julie Déchanet-Merville	Examinateur	Docteur, CNRS5164, Bordeau
Jean-Marc Gombert	Directeur de thèse	Professeur, Inserm U1082, Poitiers
André Herbelin	Co-directeur de thèse	Docteur, Inserm U1082, Poitiers

Remerciements

Je tiens avant tout à remercier le Dr. Marie Thérèse Rubio et le Pr. Jean-Pierre Couty, les rapporteurs de cette thèse, ainsi que les autres membres du jury, le Dr. Julie Déchanet-Merville et le Pr. Marc Paccalin qui ont accepté de juger ce travail.

J'adresse mes sincères remerciements au Pr. Jean-Marc Gombert et au Dr. André Herbelin de m'avoir accueillie dans leur équipe et de m'avoir donné la chance de réaliser cette thèse. Un grand merci pour votre implication dans la direction de cette thèse, pour nos échanges, ainsi que vos précieux conseils, vos encouragements continus et votre soutien humain.

Je tiens à remercier tout particulièrement le Pr. Nicolas Bourmeyster pour sa gentillesse, ses conseils scientifiques, et pour nos discussions.

Un très grand merci à Nathalie Piccirilli pour toute l'aide, l'encouragement et le soutien qu'elle a pu m'apporter au cours des deux dernières années. C'était vraiment un plaisir de travailler avec toi.

Merci à Anaïs Levescot pour son aide et pour ses conseils.

Maroua Ferhat, impossible de résumer en un merci ces années de vie commune. Mille merci pour ta présence, ta gentillesse, ta spontanéité, ton énergie... Je te remercie pour avoir partagé mon bureau de façon si agréable, pour ton écoute et tes encouragements.

Merci à tous les membres du labo Inserm Unité 1082 « IRTOMIT ». J'adresse en particulier mes remerciements à Aurélie Robin, Florence Jacomet pour leur gentillesse, leur aide et leur soutien. Je tiens à remercier également Dr. Emilie Cayssials, Déborah Desmier, Alice Barbarin, Lucie Lefèvre et Myriam Abdallah pour toute l'aide, le soutien que vous m'avez apporté. Un grand merci pour les bons moments que nous avons partagé.

Je remercie également Anne Barra et Fatima Dkhissi pour votre gentillesse et pour vos encouragements.

Merci à Tristan La Rochelle pour ses conseils et pour nos discussions.

Je remercie Hélène Cabanas pour sa gentillesse et son écoute.

Merci à Dr. Françoise Brizard et Thomas Harnois pour leur aide.

Je souhaite également remercier Sabrina Biais, secrétaire de l'école doctorale Biosanté pour l'aide qu'elle a pu m'apporter pour le côté administratif de cette thèse. A ma famille, aucun merci ne sera à la hauteur de votre amour et présence.

Table des matières

Table des figures	
Liste des abréviation	ons
Introduction généi	rale
1. Immunosu	rveillance et immunoédition des tumeurs19
1.1 Historiqu	ue
1.2 La théor	ie de l'immunoédition
1.2.1 L	es preuves du concept d'immunosurveillance 20
1.2.1.1	Chez la souris
1.2.1.2	Chez l'homme
1.2.2 L	a phase d'élimination
1.2.3 L	a phase d'équilibre
1.2.4 L	a phase d'échappement 29
1.2.4.1 phase d'	Une instabilité génétique favorisée par la phase de dormance au cours de la équilibre
1.2.4.2 par les e	L'apparition de néo-épitopes d'antigènes tumoraux qui ne seront pas reconnus ffecteurs T cytotoxiques
1.2.4.3	La perte d'expression de l'IL-15 intra-tumorale
1.2.4.4	L'expression de PD-L1 et/ou PD-1 par les cellules tumorales
1.2.4.5 l'idoléan	Expression par les cellules tumorales et/ou l'environnement péri-tumoral de nine 2,3-dioxygénase (IDO)
1.2.4.6 tumeurs	Production par les cellules tumorales ou les cellules myéloïdes associées aux de ROS et d'oxyde nitrique
1.2.4.7	Résistance à l'apoptose des cellules tumorales
1.2.4.8 T régulat	Les modifications de la niche tumorale vont favoriser le recrutement d'effecteurs teurs
1.2.4.9	Les lymphocytes Treg sont des cibles d'immunothérapie au cours des cancers 32

2.	Le	es lympl	hocytes iNKT, une population critique dans l'immunosurveillance	35
	2.1	Définit	ion des cellules iNKT	35
	2.2	Histori	que sur la découverte des cellules iNKT	35
	2.3	Localis	ation des cellules iNKT	36
	2.4	Phénot	type des cellules iNKT	37
	2.5	Ligand	s reconnus par les cellules iNKT via CD1d	37
	2.	.5.1	Ligands exogènes	37
	2	.5.2	Ligands endogènes	38
	2.6	Dévelo	ppement thymique	39
	2.7	Sous-p	opulations de cellules iNKT	42
	2.	.7.1	Cellules iNKT1	42
	2	.7.2	Cellules iNKT2	43
	2.	.7.3	Cellules iNKT17	44
	2	.7.4	Cellules iNKT10 et iNKT Foxp3 ⁺	45
	2	.7.5	Cellules iNKTFH	46
	2.8	Sous-p	opulations CD4 ⁺ et CD4 ⁻ chez l'homme	46
	2.	.8.1	Pouvoir cytotoxique des sous populations de cellules iNKT humaines	47
	2.9	Preuve	e de l'implication des cellules iNKT durant l'immunosurveillance des cancers	48
	2.10) Fonctio	ons effectrices anti-tumorales des cellules iNKT	52
	2.	.10.1	Effet indirect des cellules iNKT par modulation de la production des cytokines	52
	2	.10.2	Effet indirect des cellules iNKT en modulant le microenvironnement tumoral	53
	2.	.10.3	Effet cytotoxique direct des cellules iNKT	54
	2.11	Les cel	lules T CD8 ⁺ mémoires non conventionnelles	55
	2	.11.1	Mise en évidence chez la souris de Lymphocytes T CD8 ⁺ « innate-memory »	55
	2.	.11.2	Les cellules T CD8 ⁺ « <i>virtual-memory</i> » VM	57
	2	.11.3	Les Facteurs impliqués dans la différenciation des lymphocytes T CD8 ⁺ IMP/VM	57
	2.	.11.4	Lymphocytes T CD8 ⁺ innés chez l'homme	59
3.	Le	es cellul	es dendritiques, des partenaires privilégiés des lymphocytes iNKT	60
	3.1	Définit	ion des cellules dendritiques (DC)	60

3.2	Foncti	ons classiques des DC	60
3.3	Recon	naissance des antigènes par les DC	61
3.	.3.1	TLRs	61
3	.3.2	CLRs	62
3.	.3.3	NLRs	62
3.4	Captu	re des antigènes par les DC immatures	63
3.5	Matur	ation des DC	64
3.6	Migrat	ion des DC	65
3.7	Charge	ement des peptides sur les molécules du CMH	65
3.	.7.1	Définition des molécules du CMH	65
3.	.7.2	Le chargement des peptides sur les molécules d u CMH	66
	3.7.2.1	Molécules de CMH de classe I	66
	3.7.2.2	2 Molécules de CMH de classe II	67
3.8	Moléc	ules de CMH de classe I non classiques CD1	68
3.	.8.1	Expression et structure moléculaire de CD1d	69
3.	.8.2	Localisation et assemblage des molécules CD1d	71
3.	.8.3	Mécanisme de régulation de CD1d	72
	3.8.3.1	Généralité sur les Rho GTPase	72
	3.8.3.2	Les Rho GTPase : « interrupteurs moléculaires »	72
	3.8.3.3	Les kinases dépendantes de Rho : ROCK	74
4. La iNKT e	a leucér t DC	nie myéloïde chronique, un exemple du défaut des effecteurs de l'immunité innée	76
4.1	Introd	uction	76
4.2	Biolog	ie moléculaire du chromosome Philadelphie	77
4.	.2.1	Le gène <i>abl</i> et sa protéine	77
4.	.2.2	Le gène <i>bcr</i> et sa protéine	79
4.	.2.3	Réarrangement bcr-abl	79
4.3 leuc	Voies émogei	de signalisation contribuant à l'activité oncogénique de BCR-ABL et conduisant à nèse	la 81
4.4	Traiter	ments et définition des critères de réponse	82

2	4.4.1	Critères de réponse hématologique	82
2	4.4.2	Traitements	83
4.5	Résista	ance au traitement par l'IM	84
4.6	Implica	ation du système immunitaire dans le contrôle de la leucémie myéloïde chronique	86
2	4.6.1	Allogreffe des cellules souches hématopoïétiques	86
2	4.6.2	Implication des lymphocytes T dans l'immunité anti-leucémique	87
2	4.6.3	Implication des cellules NK dans l'immunité anti-leucémique	88
2	4.6.4	Implication des DC dans l'immunité anti-leucémique	89
2	4.6.5	Modulations de la réponse immunitaire par les différents traitements de la LMC	90
	4.6.5.1	Effets immunomodulateurs de l'IFN-α	90
	4.6.5.2	Effets immunomodulateurs de l'IM	91
	4.6.5.3 cellule	Le Dasatinib et les grands lymphocytes granuleux (GLG) : reprogrammation des s T ?	92
Résultat	s		95
I- Altéra d'un dé	ation fon faut d'ex	ctionnelle des cellules iNKT des patients en phase chronique de LMC : l'hypothè pression membranaire de CD1d par les DC myéloïdes	ese 96
Ma	nuscrit 1	L	98
Ma	nuscrit 2	2	04
II- Carac mise en	térisatio évidence	n d'une nouvelle population de lymphocytes T CD8 ⁺ innés chez l'homme adulte sai e de son déficit au cours de la LMC1	n : 32
Ma	nuscrit 3	31	33
Ma	nuscrit 4	۱1	41
Discussi	on génér	rale et perspectives 1	60
I- Anerg CD1d su	ie des ce Ir les DC	ellules iNKT : un mécanisme mettant en jeu un déficit d'expression membranaire myéloïdes1	de 61
1.	L'aner 162	gie des cellules iNKT des patients LMC-PC résulte d'un défaut cellulaire extrinsèq	ue
2.	Les DC 162	myéloïdes des patients LMC-PC ont une expression membranaire de CD1d diminu	ée
3. de	La dim maturati	ninution d'expression membranaire de CD1d résulte-t-elle d'un défaut de synthè ion de cette molécule ou d'un phénomène de rétention dans les lysosomes ? 1	se, 63

4. Le défaut d'expression membranaire de CD1d dépend en partie de l'activation de la voie Rho/ROCK
5. Le défaut d'expression membranaire de CD1d des DC des patients LMC-PC a-t-il des répercussions sur les fonctions des cellules iNKT?
 L'altération de la présentation antigénique par CD1d résulte-t-elle d'un défaut d'apprêtement ?
 PPAR-γ constitue-t-il un second élément de contrôle de l'expression de CD1d au cours de la LMC ?
8. Le défaut d'expression membranaire de CD1d dépend du domaine DH-PH de BCR-ABL en modélisation <i>in vitro</i>
9. Apport de la modélisation de la LMC <i>in vivo</i> chez la souris
10. Les cellules NK constituent un verrou immunitaire contre le développement de la LMC chez la souris
II- Répercussions physiopathologiques du défaut des cellules iNKT dans la dynamique de la réponse T innée dans la LMC
Annexe

Table des figures

Figure 1 : Rôle du système immunitaire dans la susceptibilité tumorale induite par les cancérigènes22
Figure 2 : Phénotype immunogène des tumeurs issues de souris immunodéficientes
Figure 3 : La théorie de l'immunoédition des cancers comme conséquence délétère de l'immunosurveillance
Figure 4 : Développement des cellules iNKT murines dans le thymus
Figure 5 : Rôle des cellules iNKT dans la réponse anti-tumorale
Figure 6 : Voie du CMH de classe I : Présentation des antigènes endogènes par voie directe ou des antigènes exogènes par voie croisée
Figure 7 : Voie du CMH de classe II : Capture, apprêtement et présentation des antigènes exogènes. 68
Figure 8 : Structure de la molécule CD1d : Vue de côté (A) et de dessus (B)70
Figure 9 : Structure de la molécule CD1d avec les sites de liaison à l'antigène en comparaison avec la molécule de CMH de classe I
Figure 10 : Organisation structurelle des protéines Rho
Figure 11 : Cycle d'activation et d'inactivation des protéines Rho74
Figure 12: Structure et homologies des deux isoformes ROCK
Figure 13 : Voies de signalisation activées par Rho et contrôlant le cytosquelette d'actine
Figure 14 : La translocation t(9; 22)(q34; q11) et la génération du gène chimérique BCR-ABL 77
Figure 15 : Structure de la protéine ABL codée par le gène <i>abl</i>
Figure 16 : Modèle de régulation de l'activité tyrosine kinase de c-ABL
Figure 17 : Structure de la protéine BCR
Figure 18 : Représentation schématique des translocations BCR-ABL
Figure 19 : Structure de la protéine BCR-ABL (p210)
Figure 20 : Restauration du pourcentage des cellules exprimant CD1d parmi les DC myéloïdes circulantes des patients ayant obtenu une réponse cytogénétique complète après traitement par IM. 163
Figure 21 : La diminution de l'expression membranaire de CD1d est due en partie à une rétention de cette molécule dans les lysosomes

Figure 22 : Corrélation positive entre les fonctions des cellules iNKT et l'expression de CD1d par les DC
Figure 23 : Mise en place d'un test de mesure de l'apprêtement des antigènes glycolipidiques des cellules iNKT
Figure 24 : La diminution de l'expression membranaire de CD1d dans les lignées LMTK-CD1d dépend du domaine DH-PH de BCR-ABL
Figure 25 : La transfection de BCR-ABL dans les cellules présentatrices LMTK-CD1d induit une altération de l'activation dépendante de CD1d d'un hybridome iNKT
Figure 26 : L'altération de l'expression membranaire de CD1d par les DC myéloïdes BCR-ABL(+) est dépendante de l'activité RhoGEF
Figure 27 : Mise en évidence d'un verrou immunologique dépendant des cellules NK 174
Figure 28 : Les cellules de patients avec GLG traités par Dasatinib ont un pourcentage augmenté de cellules Eomes ⁺ parmi les cellules T CD8 ⁺

Liste des abréviations

 α -GalCer : α -galactosyl-céramide

Abl : Abelson

AGL : Agelasphin

ARG1 : Arginase

Bcr : Breakpoint cluster region

BDCA-2 : Blood DC antigen 2

CDP : Common-DC progenitor

CFU-GM : Colony forming units-granulocyte/macrophage

CLRs : *C*-type lectin receptors

CLP : Common lymphoïd progenitor

CMH : Molécules du complexe majeur d'histocompatibilité

CMP : Common myeloïd progenitor

CPA : Cellules présentatrices d'antigène

CSH : Cellules souches hématopoïétiques

CTL : Cytotoxic T cells

Dbl : Diffuse B-cell lymphoma

DC : Cellules dendritiques

DMBA : Diméthylbenzanthracène

DN : Double négative (CD4⁻ CD8⁻)

DP : Double positive (CD4⁺ CD8⁺)

DRiPs : Defective ribosomal products

E4BP4 : *E4* promoter binding protein 4

EBV : Epstein barr virus

- **EMRA** : *Effector memory CD45RA*⁺
- **Eomes:** *Eomesodermine*
- Erg-2 : Early growth response protein
- **FISH** : *Fluorescence in situ hybridization*
- **FR4** : Folate receptor 4
- **GAP** : *GTPase activating protein*
- **GDP** : Guanosine diphosphate
- **GEF** : Guanine nucleotide exchange factor
- **GSL** : Glycosphongolipid
- **GTP** : Guanine triphosphate
- GVL : Graft versus leukemia
- **GVHD** : Graft versus host disease
- HLA: Human Leucocyte Antigen
- hOCT1 : Human organic cation transporter 1
- IAV : Influenza A
- **IDO** : Idoléamine 2,3-dioxygénase
- **IFN-***γ* : Interférons
- IGB3 : Glycosphingolipide
- **iNKT** : Invariant natural killer T
- IM: Imatinib
- **IMP** : *Innate memory phenotype*
- **IRF** : Interferon regulatory factors
- ITK : Inhibiteur de tyrosine kinase

Itk : Inductible T cell kinase

KI : Knock in

KO : *Knock out* (^{-/-})

Lag-3: Lymphocytes-associated-glycoprotein 3

LAL : Leucémie aiguë lymphoblastique

LAMP-1 : Lysosomal associated-membrane protein-1, CD107a

LAL : Leucémie aiguë

LIMK1 et 2 : LIM domain kinase

LPC : Lysophosphatidylcholine

LMC : Leucémie myéloïde chronique

LysoPE : Lysophosphatidylethanolamine

MAPK : Mitogen-activated protein kinase

M-bcr : Major breakpoint cluster region

m-bcr : Minor breakpoint cluster region

MCA : Méthylcholantrène

MDSC : Myeloid-derived suppressor cells

MDP : Macrophage-DC Progenitor

MICA : MHC class I polypeptide-related sequence A

MTP : Microsomal triglyceride transfer protein

NF-kB: Nuclear factor-kB

NKTFH : *NKT- follicular helper*

NK : Natural Killer

NLRs : Intracytoplasmic nucleotide oligomerization domain (NOD)-like receptors

- NLS : Nuclear localization signal
- **Nos2** : Nitric oxide synthase 2
- NRP-1 : Neuropilin-1
- **PAMPs** : Pathogen-associated molecular patterns
- **PC** : Phase chronique
- pDC : DC plasmacytoïdes
- **PE** : Phosphatidyléthanolamine
- **Pfp** : Perforine
- PG : Phosphatidylglycérol
- PH : Pleckstrine
- Ph : Philadelphie
- **PI** : Phosphatidylinositol
- PIM : Phosphatidylinositol mannoside
- PLZF : Promyelocytic leukemia zinc finger
- **PPAR-** γ : Peroxisome proliferator activated receptors
- **PRRs** : Pattern recognition receptors
- **RAG2** : *Recombinase activating gene-2*
- **RBD** : *Rho-binding protein*
- **RE** : Réticulum endoplasmique
- **Rlk** : *Resting lymphocytes kinase*
- **ROCK** : *Rho-associated*, *coiled-coil containig protein kinase*

RORyt : *Retimoic acid-related orphan receptor* y t

ROS : *Reactive oxygen species*

SAP : *SLAM-associated protein*

SH : Src homology

- ShRNA : small hairpin RNA or short hairpin RNA
- **SIDA** : Syndrome d'immunodéficience acquise

SLAM : Signaling lymphocytic-activation molecule

- TAM : Tumor associated monocytes/macrophages
- TAP1/2 : Transporter associated with antigen processing
- **TBK1** : TANK-binding kinase1

TCR : *T* cell receptor

- Tec : Tyrosine kinase expressed in hepatocellular carcinoma
- **TGF-** β : *Transforming growth Factor-* β
- TIM-3: T cell-immunoglobulin-like and mucin-containing protein 3
- **TIGIT** : *T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains*
- TLRs : Toll like receptors
- **TNF-α** : *Tumor necrosis factor-α*
- Trég : Lymphocyte T régulateur
- **VEGF**: Vascular endothelial growth factor
- **VM** : *Virtual memory*
- WT-1 : Wilms tumor 1 protein
- WT : Wilt-type
- **XLP** : Immunodeficiency X-linked lymphoproliferative disease

Avant-propos

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est une hémopathie maligne due à une translocation entre les gènes BCR (pour «*Breakpoint Cluster Region*») et ABL (pour «*Abelson*») aboutissant à la génération d'un gène chimérique codant pour une protéine dénommée BCR-ABL. Cette protéine, par son domaine tyrosine kinase (TK), a une activité constitutivement dérégulée capable de déclencher la maladie. Ceci a conduit les hématologues à développer des stratégies thérapeutiques ciblant les facteurs intrinsèques de la LMC, en particulier par l'utilisation d'inhibiteurs de TK (ITK). Ce traitement permet aux patients d'espérer une durée de vie normale, mais son utilisation thérapeutique doit être poursuivie régulièrement du fait de la persistance d'une maladie résiduelle. La possibilité d'arrêter définitivement le traitement après une rémission durable nécessite la compréhension des différents facteurs intervenant dans la survenue de la maladie résiduelle.

Nous postulons que le système immunitaire est un des facteurs à considérer afin de contrecarrer les résistances aux ITK et contrôler la maladie. En effet, on sait désormais que chez les patients traités par greffe de cellules souches allogéniques, une rémission à long terme, laquelle est obtenue sans traitement par des ITK, est fortement associée à l'induction d'une réponse immunitaire anti-tumorale efficace. Par ailleurs, l'ITK Dasatinib, en plus de son rôle d'inhiber l'activité tyrosine kinase de BCR-ABL, semble faciliter la génération de cellules appartenant au système immunitaire inné, comprenant des lymphocytes T, et présumées exercer des fonctions anti-tumorales. Dans ce travail de thèse, parmi les acteurs de l'immunosurveillance, notre choix s'est porté sur la population iNKT (pour «*invariant Natural killer* ») ayant un caractère inné et possédant un arsenal cytotoxique. De manière intéressante, chez la souris, ces cellules sont impliquées dans la génération des cellules T CD8⁺ innées.

Introduction générale

1. Immunosurveillance et immunoédition des tumeurs

1.1 Historique

Le rôle du système immunitaire dans la reconnaissance et la destruction des cellules tumorales fut énoncé pour la première fois au 19^{ème} siècle par William B. Coley, le père de l'immunothérapie anti-tumorale. Il observa des régressions spontanées de cancer chez les patients atteints d'infections aiguës (Galon et al., 2013). Coley profita de ce phénomène naturel pour développer un vaccin contenant des extraits d'un mélange bactérien dénommé « coley's toxins » stimulant le système immunitaire afin de traiter les patients atteints de sarcome osseux (Hoption Cann et al., 2003; McCarthy, 2006).

En 1909, Paul Ehrlich postula que les tumeurs se produisent spontanément dans le corps humain et que le système immunitaire doit reconnaître et éradiquer ces tumeurs avant que celles-ci soient cliniquement manifestées. Dans les années 1950, Lewis Thomas a introduit la théorie de l'immunosurveillance qui a ensuite été développée par MacFarlane Brunet. Cette théorie repose sur le rôle des cellules effectrices du système immunitaire dans l'identification et l'élimination des cellules tumorales naissantes. Celle-ci était soutenue par des résultats expérimentaux montrant un rejet des tumeurs transplantées chez des souris sauvages (Dunn et al., 2002).

Dans le but de confirmer cette théorie, de nombreuses expériences ont été réalisées. Or elles n'ont pas montré d'augmentation de susceptibilité à développer des tumeurs spontanées ou induites par le méthylcholantrène (MCA) chez des souris Nude athymiques, lesquelles étaient considérées comme dépourvues de système immunitaire. Ces résultats qui avaient contribué à abandonner l'idée de l'immunosurveillance anti-tumorale reposaient en fait sur un manque de connaissances précises des anomalies immunitaires et des fréquences des cellules immunitaires chez les souris Nude. Il est en effet maintenant bien connu que les souris Nude athymiques ne constituent pas un bon modèle d'immunodéficience du fait qu'elles ont des cellules NK (pour « *Natural Killer* ») ainsi qu'une fréquence résiduelle de lymphocytes TCR- $\gamma\delta$ et TCR- $\alpha\beta$ (pour « *T cell receptor* ») qui peuvent induire des réponses immunes innée et adaptative (Dunn et al., 2004; Galon et al., 2013).

C'est la génération des souris transgéniques permettant l'inactivation de compartiments immunitaires de manière spécifique jointe au développement des anticorps monoclonaux que le concept de l'immunosurveillance a resurgi. Ainsi, des études ont montré que des souches de souris Knock Out (KO) pour divers composants de l'immunité innée ou adaptative développent des tumeurs spontanées. Parallèlement, chez des individus immunodéprimés ou immunodéficients, des études rétrospectives ont démontré une fréquence d'apparition des tumeurs accrue.

Au cours des dernières années, il a été montré que le système immunitaire, malgré sa capacité à protéger l'hôte contre le développement tumoral, peut indirectement promouvoir l'émergence de clones résistants en éliminant les cellules les plus sensibles. Le terme immunosurveillance a donc été raffiné et renommé immunoédition. Le processus d'immunoédition définit les relations entre les cellules tumorales et le système immunitaire selon trois étapes : l'élimination, l'équilibre et l'échappement (Mittal et al., 2014; Muenst et al., 2016).

1.2 La théorie de l'immunoédition

1.2.1 Les preuves du concept d'immunosurveillance

1.2.1.1 Chez la souris

Une étape critique dans la description de l'immunosurveillance et dans l'obtention des preuves de concept a reposé sur les travaux menés par l'équipe de Schreiber (Schreiber et al., 2011; Shankaran et al., 2001). Ils concernent en particulier les travaux de Shankaran *et al.* (2001) réalisés en utilisant un modèle de cancer murin (fibrosarcome) induit par le cancérigène MCA.

Les places relatives de l'immunité adaptative et innée dans le processus d'immunosurveillance des cancers

Des souris immunocompétentes sauvages (pour «*wild-type* » ou «WT ») et des souris immunodéficientes RAG2 (pour «*Recombinase Activating Gene* ») dépourvues de lymphocytes T et B ont été injectées avec 100 μ g de MCA afin de comparer l'incidence des tumeurs. Les souris RAG2^{-/-} ont développé des tumeurs plus rapidement et avec des fréquences élevées (30/52) par rapport aux souris WT (11/57). La susceptibilité des souris RAG2^{-/-} à développer des tumeurs était comparable à celle observée par les souris insensibles à l'IFN- γ dépourvues du récepteur de l'IFN- γ (IFNGR1^{-/-}) ou du facteur de transcription

STAT1 (STAT1^{-/-}) qui joue un rôle important dans la signalisation des récepteurs de l'IFN- γ et des IFN- α/β . Afin d'évaluer l'impact de l'immunité adaptative et de l'immunité innée sur la formation des tumeurs induites par le MCA, des souris double KO RAG2^{-/-} et STAT1^{-/-} (notée RkSk) ont été générées. Après exposition au MCA, 13 parmi 18 des souris RkSk portaient des fibrosarcomes ce qui ne correspondait pas à une sensibilité plus élevée au MCA par comparaison aux souris WT ou aux souris STAT^{-/-} ou RAG2^{-/-} (Figure 1). En revanche dans un modèle d'apparition des cancers spontanés sur 21 mois, il était noté une fréquence de cancer spontané très augmentée chez les souris RkSk (82%) par rapport aux souris RAG2^{-/-} (50%) et aux souris sauvages (0%) (Schreiber et al., 2011; Shankaran et al., 2001). Ces résultats montrent de façon claire que : 1) l'immunité adaptative joue un rôle clé dans l'immunosurveillance des cancers; 2) la signalisation dépendant des cytokines et en particulier de celle du récepteur de l'IFN- γ joue un rôle aussi important; 3) l'immunité innée et l'immunité adaptative ont des fonctions non redondantes et complémentaires dans l'immunosurveillance des cancers, comme l'attestent les résultats obtenus avec les souris RkSk.

D'autres travaux ont montré que la perforine, un composant majeur de l'arsenal cytotoxique des cellules NK (pour « *Natural Killer* ») et des lymphocytes T cytotoxiques, est un élément déterminant dans l'immunosurveillance des cancers. Il existe en effet une augmentation de la fréquence des cancers induits par le MCA chez les souris perforine^{-/-} (Pfp^{-/-}) par rapport aux souris sauvages. Les souris Pfp^{-/-} ont de plus une susceptibilité accrue au développement des lymphomes spontanés et d'adénocarcinomes du poumon (Russell and Ley, 2002).



Figure 1 : Rôle du système immunitaire dans la susceptibilité tumorale induite par les cancérigènes. Plusieurs études ont montré que les souris immunodéficientes sont plus sensibles que les souris immunocompétentes après traitement avec des agents cancérigènes tels que le MCA. Les souris immunodéficientes utilisées sont des souris RAG^{-/-} ou des souris WT (Schreiber et al., 2011). D'après (Shankaran et al., 2001). Ce type d'expérience a été ultérieurement reproduit dans d'autres (Girardi et al., 2001; Russell and Ley, 2002).

Des rôles distincts dans l'immunosurveillance pour les différents effecteurs de l'immunité adaptative

L'équipe de Hayday a évalué le rôle respectif des cellules TCR- $\alpha\beta$ et TCR- $\gamma\delta$ dans l'immunosurveillance des cancers. Pour ce faire, les auteurs ont utilisé des souris TCR- $\alpha^{-/-}$ (dépourvues de lymphocytes TCR- $\alpha\beta^+$) ou des souris TCR- $\delta^{-/-}$ (dépourvues de lymphocytes TCR- $\alpha\beta^+$), chez qui ont été injectées en intradermique soit des cellules de la lignée tumorale de carcinome squameux PDV, soit le MCA ou enfin un carcinogène dérivé des esters de phorbol DMBA (pour « Diméthylbenzanthracène ») appliqué sur la peau.

Dans le modèle d'injection de la lignée de carcinome squameux PDV, les souris TCR- $\alpha^{-/-}$ présentaient une fréquence plus élevée de tumeur que celle observée chez les souris TCR- $\delta^{-/-}$, la fréquence de ce dernier groupe étant plus élevée que celle des souris sauvages. Ce premier résultat montre qu'à la fois les lymphocytes T TCR- $\alpha\beta^+$ et les lymphocytes T TCR- $\gamma\delta^+$ interviennent dans l'immunosurveillance mais probablement par des mécanismes différents.

De façon intéressante, les souris traitées par le MCA avaient une incidence augmentée et équivalente d'apparition de cancer qu'elles soient dépourvues de lymphocytes T TCR $\alpha\beta^+$ ou TCR- $\gamma\delta^+$, comparativement aux souris sauvages.

Enfin, dans le modèle d'application du DMBA, les souris TCR- $\alpha^{-/-}$ étaient protégées contre l'apparition des cancers, comparativement aux souris sauvages, alors que les souris TCR- $\delta^{-/-}$ avaient une incidence de cancer très augmentée. Ce dernier résultat suggère que les lymphocytes T TCR- $\alpha\beta^+$ ont un rôle permissif vis-à-vis de ce type d'événement transformant et démontre le rôle protecteur des lymphocytes TCR- $\gamma\delta^+$.

L'ensemble de ces observations montre que les cellules TCR- $\alpha\beta^+$ et TCR- $\gamma\delta^+$ interviennent dans l'immunosurveillance des cancers mais ont des rôles différents et agissent à des stades différents de la transformation tumorale (Girardi et al., 2001, 2003). Enfin, ce travail démontre que le système immunitaire peut favoriser la prise de tumeur et donc interférer avec l'immunosurveillance des cancers.

✤ Le rôle de l'immunité innée

De nombreux travaux ont permis de suggérer que l'immunité innée est impliquée dans l'immunosurveillance des cancers.

Le travail de Shankaran et al., (2001) décrit dans la chapitre 1.2.1.1 en est un exemple. Mais il faut aussi noter les travaux ayant montré le rôle de NKG2D (Smyth et al., 2005) ou des IFN de type I (Dunn et al., 2005) dans l'immunosurveillance des cancers. Enfin, les travaux de Smyth et al. (2000 ; 2006) et de Street et al. (2004) montrent que la déplétion des cellules NK par un traitement anti-NK1.1 utilisant l'anticorps monoclonal PK136 est associée à une perte de l'immunosurveillance vis-à-vis des métastases induites par la lignée tumorale EL4-S3 n'exprimant par les molécules du CMH de classe I (déficientes en β 2-microglobuline) (Smyth et al., 2000, 2006; Street et al., 2004).

Plusieurs travaux suggèrent que les cellules NK, par le biais des cytokines de type 1 produites, sont responsables du rejet de tumeurs, probablement à la faveur d'une coopération avec les effecteurs de l'immunité adaptative.

Plus récemment, un travail a confirmé que les cellules NK sont susceptibles de rejeter des tumeurs induites par le MCA indépendamment de la présence d'effecteurs de l'immunité adaptative. De façon intéressante, dans ce modèle, les auteurs montrent que le rejet de tumeurs dépend du recrutement de macrophages de type M1. Le recrutement de ces cellules M1 dans la tumeur nécessite que les cellules NK expriment l'IFN- γ (O'Sullivan et al., 2012).

Les effets du système immunitaire sur les cancers

Pour évaluer si le système immunitaire influence le phénotype immunogénique de tumeurs formées après injection d'un cancérigène, des auteurs ont comparé l'effet d'une transplantation des cellules tumorales provenant des souris WT ou RAG2^{-/-}. D'une manière intéressante, 40% des tumeurs dérivées des souris RAG2^{-/-} étaient rejetées quelques jours après l'injection quand elles étaient transplantées chez des souris immunocompétentes WT tandis que les tumeurs dérivées des souris immunocompétentes se développaient chez 100% des souris receveuses sauvages et RAG2^{-/-} (**Figure 2**). Ces résultats montrent que les sarcomes dérivés des souris déficientes en lymphocytes sont plus immunogéniques que ceux provenant des souris WT ayant un système immunitaire intact (Shankaran et al., 2001).



Figure 2: Phénotype immunogène des tumeurs issues de souris immunodéficientes. Des souris immunodéficientes RAG2^{-/-} ont été inoculées à J0 avec des cellules tumorales (1×10^5) provenant de souris sauvages 129/SvEv (a) ou RAG2^{-/-} (b). La croissance tumorale est déterminée par la moyenne du diamètre tumoral par souris. Les souris 129/SvEv ou RAG2^{-/-} ont été injectées à J0 avec des cellules tumorales (1×10^6) dérivées des souches sauvages 129/SvEv (c) ou RAG2^{-/-} (d) (Shankaran et al., 2001).

Le système immunitaire modifierait donc le potentiel immunogénique et/ou la pathogénicité des cancers au cours du temps. Au final, l'apparition d'un cancer chez le sujet immunocompétent serait la somme des événements de transformation des cellules tumorales et de la pression du système immunitaire aboutissant à sélectionner des sous-clones tumoraux plus agressifs. Ces résultats sont une des bases du développement du concept d'immunoédition des cancers et de ses trois phases.

1.2.1.2 Chez l'homme

La démonstration du concept d'immunosurveillance chez la souris pose la question d'un processus similaire chez l'homme. De fait, il existe une augmentation de la fréquence de cancers chez des patients ayant des déficits immunitaires de type cellulaire touchant les lymphocytes T. Dans la majorité des cas, les cancers retrouvés sont associés à des infections virales (sarcomes de kaposi, lymphome et EBV « pour *Epstein barr virus* »). De la même façon, en cas de déficit immunitaire acquis provoqué par le SIDA (Syndrome d'immunodéficience acquise) ou des traitements immunosuppresseurs de longue durée, une augmentation de la fréquence de cancers est observée. Dans le cas du SIDA, ce sont des sarcomes de kaposi, des lymphomes non hodgkiniens de type immunoblastique ou des lymphomes de Burkitt. Chez les patients transplantés traités par immunosuppresseurs, ce sont principalement des cancers coliques, pulmonaires, rénaux d'origine non virale ou des syndromes lymphoprolifératifs (Dunn et al., 2002; Mlecnik et al., 2011).

Comme chez la souris, l'arsenal cytotoxique chez l'homme joue un rôle critique dans la protection contre les cancers. En témoigne le fait que des patients ayant des mutations bialléliques du gène codant la perforine et FasL développeront des lymphomes (Clementi et al., 2005; Hayashi et al., 2006)

D'autres observations suggèrent que l'immunité innée intervient dans l'immunosurveillance des cancers chez l'homme. On notera en particulier l'observation que certains allèles de NKG2D sont associés à un risque accru de cancers de tous types. Ceci serait du au fait que ces haplotypes de NKG2D sont associés à une cytotoxicité NK moins efficace (Hayashi et al., 2006). De nombreux travaux ont par ailleurs montré que les caractéristiques de la réponse immunitaire péri-tumorale et intra-tumorale étaient des marqueurs pronostiques fiables des cancers coliques, supérieurs en valeur prédictive à la classification TNM (**T** pour Tumeur primitive, N pour ganglions lymphatique « nodes » et M métastase) (Galon et al., 2006, 2013).

1.2.2 La phase d'élimination

La phase d'élimination met à contribution les différents effecteurs de l'immunité innée et adaptative. Ce sont les travaux décrits précédemment qui ont permis d'identifier leur rôle et leur implication (Tableau 1 et Figure 3a).

Les cytokines et les signaux assurant des réponses de type Th1 et T CD8⁺ cytotoxiques ont une place prépondérante dans la phase d'élimination. Les cellules NK sont susceptibles d'intervenir elles aussi dans ce phénomène.

L'IL-12, en induisant la différenciation des cellules Th1 et la production de l'IFN- γ par les cellules NK, agit en amont dans le contrôle et la qualité de l'immunosurveillance des cancers. Au final, l'IFN- γ des lymphocytes T et des cellules NK va bloquer l'angiogenèse et la prolifération des cellules tumorales ; associée au TNF- α , l'IFN- γ va aussi induire l'entrée en sénescence des cellules tumorales. Enfin, l'IFN- γ va « armer » les macrophages intra- et péritumoraux pour les rendre cytotoxiques et leur permettre de produire le TNF- α et des ROS (pour « *Reactive oxygen species* »). Les lymphocytes T et les cellules NK seront par ailleurs directement cytotoxiques pour les cellules tumorales, d'une part, par leur production de perforine et de granzymes, et d'autre part, par la mise en jeu des récepteurs de mort *via* FasL et TRAIL.

Molécules impliquées	Rôle	Cellules impliquées et effet anti-tumoral	Références
Perforine, Granzyme	Effecteurs de la cytotoxicité	Cytotoxicité des lymphocytes T CD8 et des cellules NK vis-à-vis des cellules tumorales	(Davidson et al., 1998; Smyth et al., 2000; Street et al., 2001)
FasL/Fas ; TRAIL/TRAIL-R	Effecteurs de la cytotoxicité	Cytotoxicité des lymphocytes T CD8 et des cellules NK vis-à-vis des cellules tumorales	(Cretney et al., 2002; Smyth et al., 2001)
IFN-γ/IFN-γ-R	Cytokines Th1 produites par les lymphocytes Th1, T CD8 et les cellules NK	Effet cytotoxique vis-à-vis des cellules tumorales; « arme » les monocytes/macrophages; induit la sénescence des cellules tumorales	(Shankaran et al., 2001; Street et al., 2001)
TNF-α	Cytokine pro-inflammatoire et pro-apoptotique	Induction de l'apoptose des cellules tumorales; induit leur sénescence avec l'IFN-γ	(Braumüller et al., 2013)
IL-12/IL-12-R	Effet pro-Th1; induit l'expression de l'IFN-γ par les cellules NK	Contrôle l'expression de l'IFN-γ dans le lit tumoral	(Airoldi et al., 2005)
T-bet	Facteur de transcription contrôlant l'expression de l'IFN-γ	Contrôle l'expression de l'IFN-γ par les lymphocytes T dans le lit tumoral	(Galon et al., 2006)
IL-15/IL-15-R	Contrôle la différenciation des cellules T CD8 et NK	Permet le recrutement des lymphocytes T CD8 dans le lit tumoral	(Gillgrass et al., 2014)
IFN de type I	Maturation des cellules dendritiques	Arme les cellules dendritiques pour qu'elles présentent les antigènes tumoraux aux lymphocytes T	(Dunn et al., 2005)
NKG2D	Récepteur de MICA/MICB (homme) et Rae/H60 (souris); contrôle les fonctions des cellules NK et active leur cytotoxicité	Intervient dans la fonction cytotoxique des cellules NK	(Smyth et al., 2005)
TCR-αβ	Récepteur à l'antigène des lymphocytes $\alpha\beta$ CD4 ⁺ et CD8 ⁺	Effecteurs de l'immunité anti- tumorale	(Girardi et al., 2001)
TCR-γδ	Récepteur à l'antigène des lymphocytes γδ	Effecteurs de l'immunité anti- tumorale	(Girardi et al., 2001)

Tableau 1 : Les facteurs impliqués dans la phase d'élimination de l'immunosurveillance des cancers

1.2.3 La phase d'équilibre

Les cellules tumorales qui ont échappé à l'étape d'élimination entrent dans un état d'équilibre dynamique avec le système immunitaire (Figure 3b). Elles sont alors quiescentes, prolifèrent peu et restent sensibles à l'apoptose. Koebel et coll, (2007) ont donné le nom de masse tumorale stable (pour « *stable mass* ») à ces lésions qui étaient présentes exclusivement au site d'injection du MCA (Koebel et al., 2007).

Une faible fréquence de souris sauvages va développer ces masses tumorales stables. En effet, elles ne se développent en tumeurs que si l'animal reçoit un traitement immunosuppresseur par l'injection d'anticorps déplétant ou bloquant dirigés contre CD4, CD8 ou l'IFN- γ (Koebel et al., 2007). Lorsqu'elles sont greffées à des souris RAG^{-/-}, elles donnent des tumeurs qui se développent très rapidement. Ces résultats démontrent que l'état d'équilibre est maintenu par les effecteurs de l'immunité adaptative alors que les effecteurs de l'immunité innée jouent un rôle contingent. Ceci est bien illustré par le fait que la déplétion des cellules NK par un traitement anti-NK1.1, par l'injection d'un anti-NKG2D, ou enfin en bloquant TRAIL n'induit pas une croissance tumorale des masses tumorales stables.

Un certain nombre de résultats suggère que la phase d'équilibre dépend d'effecteurs T spécifiques d'antigènes tumoraux de type T CD4⁺ Th1 ou T CD8⁺ cytotoxiques. De ce point de vue, il existe un antagonisme entre l'IL-12, qui est un facteur pro-Th1 associé à un maintien de l'état d'équilibre et l'IL-23, une cytokine impliquée dans la différenciation Th17, qui est un facteur associé à la perte de la phase d'équilibre (Koebel et al., 2007; Mittal et al., 2014; Ngiow et al., 2013). De façon intéressante, la réponse Th1 spécifique de la tumeur semble être directement responsable de la dormance/du maintien en état de quiescence des cellules tumorales. L'association de l'IFN- γ et du TNF- α produits au cours de la réponse Th1 spécifique induit la sénescence des cellules tumorales (Braumüller et al., 2013; Mittal et al., 2014; Müller-Hermelink et al., 2008).

Au final, dans le modèle d'inoculation par le MCA, si dans la phase d'élimination l'immunosurveillance met à contribution aussi bien l'immunité adaptative que l'immunité innée, au cours de la phase d'équilibre, la quiescence tumorale est maintenue uniquement par des effecteurs de l'immunité adaptative.

Sous la pression de sélection des effecteurs de la réponse immunitaire, des clones génétiquement instables vont émerger et devenir moins immunogènes. Ils vont conduire la maladie cliniquement indétectable jusqu'à un cancer (Matsushita et al., 2012; Mittal et al., 2014; Muenst et al., 2016).

Un certain nombre d'arguments suggèrent que la phase d'équilibre de l'immunosurveillance existe aussi chez l'homme.

Il s'agit d'une part d'observations rapportant le transfert de mélanome après la greffe d'organes de donneurs décédés ayant des antécédents d'un mélanome considéré comme guéri. Sur les 28 receveurs ayant eu un organe d'un donneur considéré comme guéri d'un mélanome, 23 ont développé un mélanome provenant du donneur. De façon intéressante, le cas rapporté par Mackie et *al.*, (2003) montre que les reins transplantés ont « transféré » le mélanome du donneur plus de 10 ans après le diagnostic et la guérison clinique. Ces observations montrent de plus, que ces cancers qui étaient « silencieux » chez les donneurs ne se « réveillent » après la transplantation que parce qu'il existe une forte immunosuppression après greffe pour éviter le rejet de l'organe greffé.

Il s'agit d'autre part de l'observation chez des patients et des patientes traités par chirurgie de cancers, respectivement de la prostate et du sein, et considérés comme guéris jusqu'à 10 ans après le cancer initial, qu'il existait des cellules souches tumorales à très faible fréquence (Vessella et al., 2007).

1.2.4 La phase d'échappement

Au cours de cette phase, les cellules tumorales sélectionnées échappent au contrôle du système immunitaire en faveur du développement tumoral conduisant à l'apparition clinique du cancer (Figure 3c). Les cellules tumorales subissent des modifications et acquièrent des caractéristiques leur permettant d'échapper à la surveillance du système immunitaire. Ces caractéristiques, sans que nous ayons un souci d'exhaustivité, sont :

1.2.4.1 <u>Une instabilité génétique favorisée par la phase de dormance au cours de la phase</u> <u>d'équilibre</u>

Cette instabilité génétique est probablement un des éléments moteurs de l'échappement au système immunitaire. Elle va correspondre à l'apparition de mutations ponctuelles ou à des modifications du transcriptome sous l'effet d'un contrôle épigénétique (Koebel et al., 2007; Matsushita et al., 2012).

1.2.4.2 <u>L'apparition de néo-épitopes d'antigènes tumoraux qui ne seront pas reconnus par</u> les effecteurs T cytotoxiques

C'est un phénomène qui est directement dépendant de l'instabilité génétique. Ce processus est susceptible de faire disparaître des épitopes tumoraux reconnus au cours de la phase d'élimination et de la phase d'équilibre.

Cet « assèchement » de la réponse immunitaire anti-tumorale lié à la perte d'épitopes tumoraux est associé à l'apparition de néo-épitopes. Ces néo-épitopes, sans doute de façon liée au contexte de la niche tumorale, n'induisent pas de réponse immunitaire anti-cancéreuse (DuPage et al., 2012; Matsushita et al., 2012).

1.2.4.3 La perte d'expression de l'IL-15 intra-tumorale

L'équipe de Galon a montré qu'il existait une relation directe entre l'infiltrat lymphocytaire péri-tumoral et l'expression de l'IL-15 dans le lit tumoral. L'absence d'expression intratumorale était liée à des mutations ou à des délétions du gène codant l'IL-15 (Mlecnik et al., 2014). En l'absence d'IL-15, le nombre de lymphocytes T CD8⁺, l'expression de l'IFN- γ , des granzymes et de la perforine étaient beaucoup plus faibles dans la tumeur et le pronostic associé médiocre (Mlecnik et al., 2014). Une hypothèse est que l'IL-15 est responsable du maintien de la tonicité des lymphocytes T CD8⁺ intra-tumoraux.

Un autre travail suggère, dans un modèle de métastase de cancer du sein chez la souris, que l'IL-15 intervient pour maintenir l'état des lymphocytes T CD8⁺ et des cellules NK et qu'en son absence, il y a une accumulation de lymphocytes T CD4⁺ Th2 et de macrophages de type M2 qui interfère avec la réponse anti-tumorale (Gillgrass et al., 2014).

1.2.4.4 L'expression de PD-L1 et/ou PD-1 par les cellules tumorales

L'expression de PD-L1 par les cellules tumorales va engager la molécule PD-1 des lymphocytes T CD8 cytotoxiques et induire leur exhaustion, avec une perte de l'expression de l'IFN- γ , de l'arsenal cytotoxique (perforine, granzymes) et du potentiel prolifératif (Mittal et al., 2014). L'expression de PD-L1 par le lit tumoral semble être sous le contrôle direct des lymphocytes T CD8 intra-tumoraux, *via* la mise en jeu de l'IFN- γ (Spranger and Gajewski, 2013).

La mise en évidence de ce point de contrôle de la réponse anti-tumorale a abouti à développer le concept « *d'immune checkpoint* » de la réponse immunitaire susceptible d'être bloquée par des « *blocking checkpoint* » spécifiques. Parmi ceux-ci sont actuellement utilisés en thérapeutique des anticorps anti-PD-L1 et anti-PD-1 qui permettent chez certains patients de restaurer la réponse immunitaire.

De façon intéressante, ces nouvelles thérapies qui ciblent les *« blocking checkpoint »* (anti-CTLA-4, anti-PD-1/PD-L1, cf. infra) vont favoriser l'émergence de lymphocytes T cytotoxiques spécifiques de ces néo-épitopes tumoraux (Gubin et al., 2014; Rizvi et al., 2015). Il a été proposé à partir de résultats expérimentaux obtenus chez la souris que l'utilisation des *« blocking checkpoint »* était un moyen efficace de sensibiliser le système immunitaire à une vaccination anti-tumorale (Gubin et al., 2014).

1.2.4.5 Expression par les cellules tumorales et/ou l'environnement péri-tumoral de l'idoléamine 2,3-dioxygénase (IDO)

IDO est une enzyme qui dégrade le tryptophane. La dette métabolique en cet acide aminé essentiel et peut être la génération de produits du catabolisme du tryptophane (Kynuréine, acide kynurénique) vont bloquer la prolifération des cellules T $CD8^+$, augmenter l'apoptose des cellules T $CD4^+$ ainsi que la différenciation des lymphocytes T $CD4^+$ Treg (T $CD4^+$ régulateurs) (Balachandran et al., 2011; Mellman et al., 2011; Schreiber et al., 2011). Le travail de l'équipe de Gajewski (Spranger et Gajewski, 2013) suggère de façon convaincante que l'acquisition d'IDO par les cellules tumorales est une réponse locale de la tumeur à l'infiltrat de lymphocytes T $CD8^+$ et en particulier à leur production d'IFN-γ.

1.2.4.6 <u>Production par les cellules tumorales ou les cellules myéloïdes associées aux</u> <u>tumeurs de ROS et d'oxyde nitrique</u>

Les cellules tumorales, sous l'action des oncogènes, de la prolifération et du métabolisme anaérobie associé à la prolifération tumorale, acquièrent la capacité de produire des ROS et l'oxyde nitrique. Les cellules myéloïdes suppressives (ou MDSC pour «*Myeloid Derived Suppressor Cells* ») constituent une autre source de ROS dans le lit tumoral.

La production de ROS est un des facteurs de l'inflammation de bas grade, qui associé au TNF- α , peut favoriser l'apparition d'un cancer. Cette production de ROS augmente au cours de la phase d'échappement, probablement sous l'effet de l'augmentation de la prolifération tumorale. C'est la mise en jeu de cette production de ROS ainsi que de celle d'oxyde nitrique qui va inhiber les fonctions des lymphocytes T CD8⁺ (Ostrand-Rosenberg and Sinha, 2009).

1.2.4.7 Résistance à l'apoptose des cellules tumorales

L'induction de la sénescence et la capacité à rentrer en apoptose est une caractéristique des cellules tumorales au cours de la phase d'équilibre, *ie* dans « la masse tumorale stable » (Koebel et al., 2007). En revanche, dans les tumeurs évolutives, il existe une perte de la sensibilité à l'apoptose qui est en partie liée à l'activation des facteurs de transcription anti-apoptotiques STAT3 et BCL-2.

Il existe de plus une insensibilité des cellules tumorales aux facteurs antiprolifératifs permettant l'obtention d'un potentiel invasif métastatique (Mantovani, 2009).

1.2.4.8 <u>Les modifications de la niche tumorale vont favoriser le recrutement d'effecteurs T</u> <u>régulateurs</u>

Les modifications des cellules tumorales au cours du phénomène d'immunoédition aboutissent à des modifications du micro-environnement tumoral qui comprennent une diminution de l'infiltrat par les lymphocytes T $CD8^+$, une perte de l'expression de l'arsenal cytotoxique et de l'IFN- γ . Cette diminution des lymphocytes T cytotoxiques peut être compensée par un recrutement et/ou la génération de lymphocytes T $CD4^+$ Treg. A cet égard, on soulignera que l'expression d'IDO et des catabolites du tryptophane (Balachandran et al., 2011) ainsi que de PD-1 sont des signaux susceptibles d'induire la différenciation de lymphocytes T $CD4^+$ en lymphocytes T $CD4^+$ Treg.

Ces lymphocytes T CD4⁺ Treg vont jouer un rôle critique dans l'échappement, en favorisant l'anergie des lymphocytes T CD8⁺ intra-tumoraux et en diminuant le recrutement des lymphocytes T dans le lit tumoral. Les mécanismes mis en jeu par ces cellules Treg sont nombreux ; de façon non exhaustive, on retiendra : 1) le blocage des signaux de costimulation par la mise en jeu de CTLA-4; 2) l'engagement par PD-L1 de la molécule PD-1 des lymphocytes T cytotoxiques; 3) la production de TGF- β et d'IL-10; 4) la consommation (ou vol) de l'IL-2 nécessaire aux lymphocytes T cytotoxiques (Mittal et al., 2014).

1.2.4.9 Les lymphocytes Treg sont des cibles d'immunothérapie au cours des cancers

Les lymphocytes T CD4⁺ Treg vont bloquer la maturation de la réponse T cytotoxique antitumorale et plusieurs molécules membranaires des lymphocytes T CD4⁺ Treg comprenant CTLA-4, TIM-3 (pour «*T Cell-Immunoglobulin-Like and mucin-containing protein 3* »), TIGIT (pour «*T cell Immunoreceptor with Ig and ITIM domains* ») et Lag-3 (pour *« Lymphocyte-associated-glycoprotein 3 »* ou CD223) sont susceptibles de favoriser ce phénomène (Gubin et al., 2014; Johnston et al., 2014; Matsuzaki et al., 2010; Sakuishi et al., 2010; Woo et al., 2012). Ces molécules jouent des rôles d'*« immune checkpoint »* et peuvent à ce titre être ciblées par des molécules thérapeutiques. Actuellement il existe des anticorps thérapeutiques ciblant CTLA-4 et bloquant l'effet permissif des lymphocytes T CD4⁺ Treg sur la croissance tumorale (Kvistborg et al., 2014). Concernant Lag-3, il n'existe pas encore d'anticorps thérapeutique utilisé chez l'homme mais des travaux sont en cours chez la souris pour tester l'effet de son ciblage comme preuve de concept d'une future stratégie de type *« blocking checkpoint »* (Matsuzaki et al., 2010; Mittal et al., 2014; Woo et al., 2012) et pour revue concernant les futures stratégies ciblant des *« immune checkpoint »* voir (Le Mercier et al., 2015).

Probablement sous l'effet des lymphocytes T CD4⁺ Treg, il existe une conversion des macrophages pro-inflammatoires et anti-tumoraux de type M1 en macrophages associés aux tumeurs (TAM pour « *Tumor associated monocytes/macrophages* ») qui ont une capacité très faible à lyser les cellules tumorales, à présenter les antigènes aux lymphocytes T et à activer les cellules NK après production des cytokines. Ces cellules secrètent un grand nombre de facteurs de croissance proangiogéniques comme le VEGF (Dunn et al., 2004).

En conclusion, le système immunitaire est capable d'éliminer les cellules tumorales mais aussi de contrôler des cellules cancéreuses en état de dormance pour de très longues périodes. Sur le plan thérapeutique, l'objectif actuel par différentes stratégies, y compris des traitements ciblés visant les « *immune checkpoint* » est de restaurer l'état d'équilibre au cours duquel le système immunitaire contrôle la tumeur, ceci par différentes stratégies comprenant entre autres des traitements ciblant les « *immune checkpoints* ».



Figure 3: La théorie de l'immunoédition des cancers comme conséquence délétère de l'immunosurveillance (a) La phase d'élimination est la phase au cours de laquelle l'immunité innée et adaptative travaillent ensemble pour détecter et détruire les tumeurs en développement avant qu'elles deviennent cliniquement visibles. Les cellules normales (bleu) sont transformées en cellules tumorales (rose) (b) Dans la phase d'équilibre, le système immunitaire se trouve dans un état de dormance. Certaines cellules tumorales subissent des modifications génétiques et épigénétiques en raison de la pression constante du système immunitaire. Les cellules tumorales évoluent et deviennent moins immunogènes et donc résistantes à la reconnaissance par le système immunitaire (c) Durant la phase d'échappement, le système immunitaire n'est plus capable d'inhiber la croissance tumorale, provoquant alors une maladie cliniquement apparente (Mittal et al., 2014).
2. <u>Les lymphocytes iNKT, une population critique dans</u> <u>l'immunosurveillance</u>

2.1 Définition des cellules iNKT

Les cellules iNKT (pour «*invariant Natural Killer T cells* ») sont des lymphocytes T qui expriment des récepteurs des cellules NK et un TCR- $\alpha\beta$ semi-invariant restreint par la molécule du CMH de classe I non classique CD1d. Ce TCR utilise une chaîne α unique formé d'un réarrangement V α 24 J α 18 chez la souris et V α 14 J α 18 chez l'homme.

2.2 Historique sur la découverte des cellules iNKT

Trois publications indépendantes en 1987 ont décrit chez la souris l'existence d'une population de lymphocytes T caractérisés par l'absence d'expression de CD4 (L3T4) et CD8 (Lyt-2). Ces cellules expriment le TCR-αβ associé à la chaîne complémentaire du TCR CD3 avec des niveaux élevés du transcrit de la chaîne β et des niveaux très diminués de la chaîne α . Elles apparaissent dans le thymus durant le développement fœtal mais plus tardivement que les cellules conventionnelles (Budd et al., 1987; Ceredig et al., 1987; Fowlkes et al., 1987). Au début des années 1990, il a été montré que les cellules T présentant un TCR- $\alpha\beta$ CD4⁻ CD8⁻ expriment aussi le récepteur NK1.1, spécifique des cellules NK (Levitsky et al., 1991; Sykes, 1990). Ces cellules T- $\alpha\beta^+$ NK⁺ représentent 0.4% des thymocytes, 5% des cellules T de la rate et 40,5% des cellules T de la moelle osseuse. Surtout, dès 1995, il a été montré qu'une grande proportion de ces cellules T- $\alpha\beta^+$ NK⁺ exprime un TCR invariant composé d'une chaîne invariante (V α 14⁺) codée par le gène V α 14 J α 281 avec une chaîne V β (V β 8.2, V β 7, ou V β 2). Ainsi, 20% des thymocytes T- $\alpha\beta^+$ NK⁺ et près de 50% de ces cellules présentes dans la rate et la moelle osseuses sont $V\alpha 14^+$ (Makino et al., 1995). Parallèlement, des analyses moléculaires de cDNA à partir des cellules T $\alpha\beta$ doubles négatives (DN) humaines ont révélé une expression préférentielle du TCR composé de la chaîne Va24-Ja18 appariée principalement à une chaîne Vβ11(Dellabona et al., 1993, 1994; Porcelli et al., 1993). Enfin, et à la différence des cellules T conventionnelles, ces cellules ont été identifiées comme étant capables de reconnaître des antigènes de nature glycolipidique associés à la molécule du CMH-I non classique, le CD1d (Exley et al., 1997; Lantz and Bendelac, 1994). Le premier ligand ayant été identifié est le glycosphingolipide α -galactosyl-céramide (α -GalCer) « KRN7000 », lequel avait été isolé à partir d'une éponge marine (*Agelas mauritianus*) et ayant des propriétés anti-cancéreuses (Kobayashi et al., 1995). La découverte de ce ligand a permis de faciliter l'étude des cellules iNKT en créant des tétramères de CD1d/ α -galactosyl-céramide. Ces tétramères permettent de détecter les cellules iNKT murines et humaines par cytométrie en flux. De plus, un anticorps clonotypique 6B11 a été mis en évidence permettant d'identifier les cellules iNKT humaines en se fixant sur la chaîne α invariante V α 24-J α 18 (Montoya et al., 2007; Tahir et al., 2001).

En plus des cellules iNKT ou NKT de type I qui utilisent donc la chaîne α du TCR V α 14/24 invariante restreinte à la reconnaissance des glycosphingolipides présentés par le CD1d, il a été identifié d'autres populations de cellules NKT regroupées sous la dénomination « NKT de type II » ou dNKT pour « *diverse NKT* ». Ces cellules sont restreintes par CD1d mais à la différence des cellules iNKT, elles ne reconnaissent pas des glycosphingolipides et n'utilisent pas la chaîne V α 14/24 (pour revue Brennan et al., 2013).

2.3 Localisation des cellules iNKT

Les cellules iNKT humaines et murines expriment des récepteurs aux chimiokines permettant de réguler leur localisation et leur distribution. Chez la souris, ces cellules représentent 0.5% des cellules T du sang. Elles se trouvent majoritairement dans la rate et le foie où elles représentent respectivement près de 1-2% et 20-30% des lymphocytes T CD3⁺. Cependant, ces cellules sont moins représentées (près de 0.5% des cellules T CD3⁺) dans la moelle osseuse, le thymus, les ganglions lymphatiques et les poumons. Par comparaison aux cellules T conventionnelles, la circulation des cellules iNKT entre les tissus est limitée. L'expression de la molécule LFA-1 par les lymphocytes iNKT permet leur rétention dans le foie (Emoto et al., 1999). Par ailleurs, l'interaction de CXCR6 exprimé par les cellules iNKT hépatiques avec CXCL6 présent à la surface des cellules endothéliales assure la survie de ces cellules (Geissmann et al., 2005).

Chez l'homme, les cellules iNKT semblent être dix fois moins nombreuses que chez la souris. Elles forment 0.1-0.2% des cellules T présentes dans le sang périphérique mais leur nombre peut varier d'un facteur de 1000 entre les différents individus. Elles sont bien représentées dans l'omentum formant 10% des cellules T où elles diminuent en nombre en situation d'obésité. De plus, dans des conditions inflammatoires, une réduction du nombre des cellules iNKT dans le sang périphérique a été observée qui semble due au recrutement de ces cellules dans le tissu inflammé. Par ailleurs, une augmentation du nombre de ces cellules dans le sang et les poumons a été mise en évidence chez les patients souffrant d'une drépanocytose (Wallace et al., 2009).

2.4 Phénotype des cellules iNKT

Le phénotype invariant du TCR des cellules iNKT est retrouvé chez l'homme, la souris, le rat, le cochon et d'autres mammifères à l'exception des ruminants, ce qui suggère que cette population est conservée au cours de l'évolution. Chez l'homme, ce TCR est formé d'un réarrangement V α 24 J α 18/V β 11 dont l'équivalent chez la souris est V α 14 J α 18/V β 8.2, V β 7, ou V β 2.

Chez la souris, on distingue des cellules qui expriment le co-récepteur CD4 (cellules CD4⁺/CD8⁻) ou non (cellules doubles négatives : CD4⁻CD8⁻). En plus du TCR invariant et des co-récepteurs, des marqueurs des cellules NK, tels que NK1.1, CD122, NKG2D, NKG2A et Ly49-A sont également exprimés à la surface des cellules iNKT. En périphérie, ces cellules expriment les marqueurs des cellules mémoires (CD44) et des cellules activées (CD69) (Bendelac et al., 1997).

Chez l'homme, on retrouve trois sous-populations iNKT matures sur la base de l'expression des co-récepteurs CD4 et CD8 : les populations CD4⁺/CD8⁻, CD4⁻/CD8⁺ et CD4⁻/CD8⁻. Elles ont un phénotype mémoire exprimant le marqueur CD45RO ainsi que des marqueurs des cellules NK tels que CD161, CD56, CD16, NKG2A, NKG2D.

2.5 Ligands reconnus par les cellules iNKT via CD1d

2.5.1 Ligands exogènes

La molécule CD1d présente des ligands lipidiques ou glycolipidiques qui sont reconnus par le TCR des cellules iNKT. Ces ligands dérivent des bactéries ou des mammifères. Le premier ligand identifié a été extrait d'une éponge marine appartenant à la famille d'*Agelasphin* (AGL) et ayant une activité anti-tumorale. Il s'agit de l'alpha-Galactosyl-céramide (α -GalCer). Cette structure a été modifiée pour obtenir une efficacité optimale et dénommée KRN7000 (Bendelac et al., 2007a; Natori et al., 1994).

Plusieurs études ont identifié une large gamme d'antigènes d'origine microbienne reconnus par les cellules iNKT. Le phosphatidylinositol mannoside (PIM) purifié chez *Mycobacterium bovis* a été montré comme stimulant des cellules iNKT humaines et murines qui induit la cytotoxicité et la production d'IFN- γ par ces cellules (Fischer et al., 2004). D'autres bactéries de la famille des *Sphingomonas* avec l' α -galacturonosyl et l' α -glycuronosyl-céramide (que l'on dénomme GSL (pour « *glycosphingolipid* ») peuvent induire l'activation des cellules iNKT (Bendelac et al., 2007).

2.5.2 Ligands endogènes

Il a été montré que les constituants membranaires (phospholipides) des cellules peuvent être reconnus comme ligands de CD1d. Le phosphatidylinositol (PI), le phosphatidylglycérol (PG) ou la phosphatidyléthanolamine (PE) présentés par le CD1d murin sont capables de stimuler des hybridomes iNKT exprimant le TCR V α 14V β 8.2 (Gumperz et al., 2000). Chez l'homme, le LPC (pour lysophosphatidylcholine) qui joue un rôle de messager lipidique et qui est présent à des taux élevés durant les réponses inflammatoires a été identifié comme ligand naturel des cellules iNKT (Fox et al., 2009).

Par ailleurs, il a été démontré que le glycosphingolipide IGb3 (pour isoglobotrihexosylcéramide), tant dans sa forme naturelle que synthétique, peut activer la majorité des cellules iNKT humaines et murines après la présentation par les cellules dendritiques ou en utilisant un complexe CD1d/IGb3. Son efficacité de stimulation est de 10 à 100 fois plus faible par comparaison à l' α -GalCer (pour revue, Brennan et al., 2013).

Les ligands endogènes des lymphocytes iNKT sont peu ou pas connus à ce jour. En 2007, un travail a proposé IGb3 comme un ligand endogène stimulant les cellules iNKT. En effet, les souris déficientes en β -hexosaminidase-B, un enzyme clé dans la dégradation de l'IGb4 en IGb3 dans le lysosyme, perd 95% de la production des cellules NKT thymique. De plus, les thymocytes provenant de ces souris sont incapables de stimuler les hybridomes NKT Va14 (Bendelac et al., 2007a). Il est cependant difficile de conclure qu'IGB3 est un ligand physiologique important des cellules iNKT si l'on considère les travaux montrant que les souris déficientes en IGb3 synthase ont un développement des cellules iNKT normal (pour revue, Brennan et al., 2013).

Plus récemment, en utilisant un anticorps spécifique du complexe CD1d-α-GalCer, des travaux ont révélé que les ligands endogènes responsables de l'activation des cellules iNKT et

de leur sélection positive dans le thymus sont probablement l'α-monoglycosylcéramide et l'αglucosylcéramide (Kain et al., 2014, 2015).

D'autres lipides ont été identifiés dans la sélection thymique tel que le lysophosphatidyléthanolamine (lysoPE) qui est un lipide à base de glycérol. En effet, un déficit en lysoPE a montré un impact sur le développement des cellules iNKT, avec une réduction forte du nombre de celles-ci (pour revue, Brennan et al., 2013).

2.6 Développement thymique

Les précurseurs des cellules iNKT sont communs aux cellules T conventionnelles et dérivent des cellules souches hématopoïétiques (CSH) de la moelle osseuse. Ils se différencient dans le thymus comme l'atteste leur absence chez les souris athymiques (Nude). Deux modèles théoriques ont été proposés concernant leur mode de développement thymique. Le modèle de pré-engagement suggère que les cellules iNKT se développent durant l'embryogenèse, même avant le développement du thymus ou l'apparition des cellules T conventionnelles. Il est par ailleurs établi que le facteur de transcription ROR γ t (pour «*Retimoic acid-related orphan receptor yt* ») facilite le développement des cellules iNKT au stade double-positif (CD4⁺CD8⁺ ou DP) (Bezbradica et al., 2005).

Seule l'interaction avec une cellule présentatrice d'antigène exprimant CD1d permet aux précurseurs des cellules iNKT de se différencier en cellules iNKT. Par ailleurs, le modèle conventionnel propose un précurseur DP commun pour les cellules iNKT et les cellules T conventionnelles $CD4^+$ ou $CD8^+$. Ainsi, l'interaction avec une cellule présentant le CD1d couplé à un antigène glycolipidique va induire la différentiation du précurseur en cellule iNKT. La découverte du tétramère CD1d spécifique du TCR invariant a permis une grande avancée dans la compréhension et l'identification des stades du développement des cellules iNKT. Il est maintenant clair que les cellules conventionnelles T- $\alpha\beta$ et les cellules iNKT proviennent d'un même précurseur triple négatif (CD3⁻CD4⁻CD8⁻). Durant le stade DP (CD4⁺CD8⁺), l'expression et le réarrangement du TCR V α 24J α 18 se produit permettant l'engagement du lignage iNKT (pour revue, Das et al., 2010; Pear et al., 2004).

Le développement intrathymique se fait immédiatement après la sélection positive et l'acquisition du marqueur CD69 par les thymocytes DP (CD4⁺CD8⁺).

L'expression de CD1d par les cellules thymiques DP corticales est requise pour la sélection positive des cellules iNKT. En effet, les souris CD1d^{-/-} sont caractérisées par l'absence de

cellules iNKT alors qu'elles se développent normalement chez une souris transgénique (pLck-hCD1d) exprimant exclusivement CD1d dans les cellules corticales thymiques. La sélection positive se fait au stade DP par une interaction homotypique entre deux thymocytes DP impliquant deux signaux : un signal mettant en jeu l'interaction entre TCR- $\alpha\beta$ et le complexe antigène du soi-CD1d et un signal généré par l'engagement de SLAM (pour « *signaling lymphocytic-activation molecule* », noté aussi FLSAMF1 ou CD150) et Ly108 (SLAMF6). Ces signaux permettent le recrutement de l'adaptateur SAP (pour « *SLAM-associated protein* ») et de la Src kinase Fyn qui joue un rôle essentiel dans l'expansion et la différenciation des cellules iNKT. L'implication de la signalisation SLAM-SAP dans le développement des cellules iNKT a été mis en évidence chez la souris SAP^{-/-} et chez les patients XLP (pour « *immunodeficiency X-linked lymphoproliferative disease* ») ayant une mutation au niveau du gène codant SAP et qui sont caractérisés par une perte complète des cellules iNKT (Griewank et al., 2007; Latour, 2007).

Après la sélection positive, les précurseurs de cellules iNKT sont CD69⁺, CD24⁺ et expriment un niveau élevé de facteur de transcription Egr-2 (pour *« early growth response protein »*). Egr-2 module des gènes impliqués dans le développement des cellules iNKT comme l'expression du facteur de transcription PLZF (pour *« Promyelocytic Leukemia Zinc Finger ou « Zinc finger, Broad complex, Tramatrack, Bric à brac poxvirus »*), un membre de la famille des facteurs de transcription BTB-POZ-ZF. Egr-2 est recruté au niveau du promoteur de PLZF,après engagement du TCR et de la molécule de co-stimulation Ly108 (Dutta et al., 2013; Savage et al., 2008). L'expression du facteur de transcription PLZF permet l'acquisition des propriétés effectrices telles que la production des cytokines immédiatement après stimulation (Savage et al., 2008).

Les cellules Egr-2⁺ au stade 0 sont CD4⁺ et ne prolifèrent pas. Elles continuent leur maturation et entrent dans le stade 1. L'expression de CD24 et de CD69 est diminuée et les cellules passent dans une phase de prolifération intense afin d'amplifier le pool des cellules iNKT. Une partie de ces cellules perd l'expression de CD4 donnant naissance aux cellules iNKT DN. Par ailleurs, les cellules à ce stade expriment fortement le facteur de transcription PLZF. En passant au stade 2, les cellules acquièrent un phénotype mémoire avec l'expression de CD44. La majorité de ces cellules CD24⁻CD44⁺NK1.1⁻ migrent dans les tissus périphériques en expriment différents marqueurs de la famille NK comme NKG2A et des marqueurs des cellules activées tels que CD69 et CD122. Après la sélection positive et durant la maturation dans le thymus, les cellules iNKT sont fonctionnelles et capables de répondre à

une stimulation par le TCR. La production des cytokines est dépendante de stade de développement. Par exemple, les cellules au stade 1 produisent l'IL-4 après l'engagement du TCR. En revanche, celles du stade 2 produisent l'IL-4 et l'IFN- γ et peuvent exprimer des effecteurs cytolytiques comme la perforine, les granzymes et Fas ligand (Constantinides and Bendelac, 2013; Das et al., 2010).

Les cellules iNKT restant dans le thymus au stade 2 se divisent en deux sous populations : une sous population notée iNKT2 PLZF⁺ qui exprime fortement GATA-3 et qui produit l'IL-13 et l'IL-4 après stimulation *via* le TCR et celle notée iNKT17 qui exprime ROR γ t⁺ et ayant une expression PLZF intermédiaire. Enfin, au stade 3, les cellules se caractérisent par une prolifération réduite et par l'expression des marqueurs NK1.1 et CD44. De plus, ces cellules perdent l'expression de PLZF, acquièrent le marqueur CD122 et l'expression de facteur de transcription T-bet. Cette population qui est nommée iNKT1 produit essentiellement l'IFN- γ et très peu l'IL-4 (**Figure 4**) (Gapin, 2016).

Chez l'homme, le développement des cellules iNKT est plus difficile à étudier. Il est similaire en termes d'apparition du CD4 et du CD161 avec un phénotype CD4⁺CD161⁻ pour les cellules iNKT les plus immatures. Contrairement à ce qui a été décrit chez la souris, on ne retrouve pas de cellules iNKT humaines au stade 3 dans le thymus, cette étape terminale de différenciation semblant avoir lieu uniquement en périphérie. Les cellules iNKT humaines sortent donc du thymus à l'état CD4⁺CD161⁻ et terminent leur maturation en périphérie où elles acquièrent CD161 et peuvent alors exprimer CD8 ou bien évoluer vers un stade double négatif (Baev et al., 2004; Berzins et al., 2005).



Figure 4 : Développement des cellules iNKT murines dans le thymus. Les marqueurs de surface, les facteurs de transcription ainsi que le profil d'expression des cytokines (après activation *via* le TCR) pour chaque souspopulation sont indiqués sur la figure d'après (Gapin, 2016).

2.7 Sous-populations de cellules iNKT

Les cellules iNKT quittent le thymus et se déplacent vers la périphérie au stade 2 (CD44⁺ NK1.1⁻) ou au stade 3 (CD44⁺ NK1.1⁺) du développement. Malgré le répertoire très limité du TCR invariant des cellules iNKT, on distingue plusieurs sous-populations qui différent dans le phénotype et la fonction. Tout comme les lymphocytes T, les cellules iNKT peuvent être classés en iNKT1, iNKT2, iNKT17, iNKT-Follicular Helper (NKTFH) et iNKT10, ceci en se basant sur les différences d'expression de facteurs de transcription et de profil de production des cytokines (Kim et al., 2015).

2.7.1 Cellules iNKT1

Les cellules iNKT1 constituant 90% des cellules iNKT murines de la moelle osseuse et du foie ont un profil cytokinique de type Th1 et expriment NK1.1, le marqueur des cellules NK.

Cette population se développe dans le thymus et apparaît à partir de stade 2 de différenciation des cellules iNKT. Ces cellules n'expriment pas le récepteur IL-17RB et peuvent avoir un phénotype CD4⁺ ou CD4⁻. Elles expriment faiblement GATA-3 et fortement le facteur de transcription T-bet qui joue un rôle important dans les stades finaux de maturation des cellules iNKT. En absence de T-bet, le nombre des cellules iNKT diminue et leur développement est bloqué au stade 2 (CD44⁺NK1.1⁻). La prolifération de ces cellules est dépendante de l'IL-15, en accord avec leur expression du marqueur CD122, le récepteur spécifique de la chaîne β de l'IL-15. De plus, il a été montré que les souris déficientes en IL-15 (IL-15^{L117}) ont un pourcentage très réduit des cellules IL-17RB⁻ iNKT. Il faut noter que le pourcentage total des cellules iNKT et des cellules NK diminue de 50% dans la rate et de 90% dans le foie indiquant l'importance de l'IL-15 dans le développement de ces cellules. De même, les cellules iNKT thymique T-bet^{-/-} n'expriment pas CD122 et ne prolifèrent donc pas en réponse à une stimulation par l'IL-15. Les cellules iNKT chez les souris déficientes en T-bet n'ont pas d'activité cytolytique et ne sont pas capables de produire l'IFN- γ suite à une stimulation du TCR. Les cellules iNKT thymiques et périphériques en « steady state » expriment les transcrits de gènes impliqués dans la réponse Th1 tels que Ifng, Tbx21, et stat4. Elles sont caractérisées par une forte expression de l'ARNm d'un des deux composants du récepteur de l'IL-12, IL12rb2. Les cellules produisant l'IFN-y suite à une stimulation par l'IL-12 sont majoritairement NK1.1⁺, même si une partie des cellules iNKT NK1.1⁻ peuvent libérer l'IFN- γ . En périphérie, l'expression des récepteurs aux chemiokines détermine la distribution des cellules iNKT1. Ainsi, la majorité des cellules iNKT1 présentes dans le foie est dépendante de l'expression de CXCR6 (Brennan et al., 2013; Das et al., 2010; Germanov et al., 2008; Watarai et al., 2012).

2.7.2 <u>Cellules iNKT2</u>

Les cellules iNKT2 (Th2-like iNKT) sont IL-17RB⁺, CD4⁺, NK1.1⁻ et produisent l'IL-4, l'IL-9, l'IL-10 et l'IL-13 après activation par le TCR. Ces cellules sont réactives à l'IL-25 et sont enrichies dans les poumons où elles contribuent à l'hyperréactivité des voies aériennes dépendantes de l'IL-25. Elles n'expriment pas le facteur de transcription T-bet et elles correspondent probablement aux cellules présentes chez les souris T-bet^{-/-}. Les cellules iNKT2 expriment des niveaux élevés des transcrits de gènes impliqués dans la réponse Th2 tels que *IL-4*. En revanche, le facteur de transcription responsable de la production des cytokines Th2 par les cellules iNKT n'est pas encore identifié. GATA-3, qui régule les fonctions des cellules Th2, est exprimé par toutes les cellules iNKT. Malgré son importance dans le développement thymique des cellules iNKT, il a été montré qu'une petite population des cellules iNKT qui se développe chez les souris déficientes en GATA-3 présente un défaut de production des cytokines de type Th2. De plus, il est possible que l'expression de GATA-3 en absence de T-bet et de ROR γ t permette le développement des cellules iNKT2. Le facteur de transcription E4BP4 (pour «*E4 promoter binding protein 4* ») semble jouer un rôle dans la production des cytokines de type Th2. En effet, les souris E4BP4^{-/-} ont une production réduite en IL-10 et IL-13 en réponse à une stimulation par l'IL-25 ou par l' α -GalCer, au contraire de l'IFN- γ et de l'IL-4 dont la production reste intacte. De plus, il a été montré qu'E4BP4 n'est pas spécialement associé à un phénotype iNKT de profil pro-Th2 mais qu'il est requis pour une meilleure production des cytokines de type Th17 par les iNKT (Brennan et al., 2013; Lee et al., 2013; Watarai et al., 2012). Enfin, ces cellules expriment fortement PLZF et sont impliquées dans la génération de cellules T CD8⁺ innées que nous détaillerons à la fin de cette partie de notre introduction générale.

2.7.3 <u>Cellules iNKT17</u>

RORγt joue un rôle important dans la différenciation des cellules iNKT en cellules iNKT17 capables de produire en grande quantité la cytokine pro-inflammatoire IL-17 en réponse à une stimulation par le TCR. Cette population de phénotype CD4⁻NK1.1⁻IL-17RB⁺ est présente dans le thymus mais aussi dans les organes périphériques comme le foie, la rate, les poumons et les organes lymphoïdes secondaires. Les cellules iNKT17, au contraire des cellules Th17 conventionnelles, ne nécessitent pas la présence d'IL-6, de TGF- β ou d'IL-23 pour produire l'IL-17 (Das et al., 2010). Elles expriment des niveaux élevés des transcrits codant des gènes impliqués dans la réponse Th17 comme *IL17a, IL-22, IL-23R*. En réponse à l'IL-23, ces cellules produisent non seulement l'IL-17 mais aussi l'IL-22 et pas l'IFN- γ . Chez les souris déficientes en IL-17RB, le pourcentage de cellules (NKT2 et NKT17) diminue avec un défaut de production des cytokines IL-17 et de type Th2. L'expression des chémokines CCR4 et CCR7 a été identifiée sur les cellules iNKT IL-17RB⁺ et non iNKT IL-17RB⁻. Les cellules IL-17RB⁺ sont présentes dans les poumons, les ganglions lymphatiques mésentériques et inguinaux et sont peu détectables dans la moelle osseuse (Watarai et al., 2012).

2.7.4 <u>Cellules iNKT10 et iNKT Foxp3⁺</u>

A côté des cellules iNKT1, iNKT2 et iNKT17 qui se développent dans le thymus, il existe aussi des sous-populations de cellules iNKT dénommées iNKTFH et iNKT FOXP3⁺ qui apparaissent après stimulation (immunisation). Le traitement des souris par l' α -GalCer protège de l'EAE avec une augmentation du nombre et de fréquence des cellules iNKT Foxp3⁺. Il a été montré que les cellules iNKT en présence de TGF- β (pour *« Transforming Growth Factor »*) expriment Foxp3, CD25, CTLA-4, GITR, CD103 et sont incapables de produire l'IL-4 et l'IFN- γ après re-stimulation. Ces cellules sont NK1.1⁻, NKG2D⁺ et expriment PLZF (Monteiro et al., 2010).

Chez l'homme, elles sont présentes au « *steady state* » mais à des faibles fréquences. Après traitement par le TGF- β , les cellules iNKT humaines en présence d' α -GalCer expriment le facteur de transcription Foxp3, lequel est associé à des activités suppressives. Les cellules iNKT Foxp3⁺ sont préférentiellement CD4⁺ et expriment le marqueur CD25. Une diminution de la production d'IFN- γ et d'IL-4 a été observée après traitement des cellules iNKT par le TGF- β avec une augmentation de celle de l'IL-10, une cytokine produite par les cellules T régulatrices (Moreira-Teixeira et al., 2012).

En accord avec ces données, une étude de 2014 décrit une population iNKT10 caractérisée par l'expression des marqueurs inhibiteurs trouvés sur les cellules T conventionnelles régulatrices (Treg) tels que CD279 (PD-1), CD152 (CTLA4), neuropilin-1 (NRP1), FR4 (pour « folate receptor 4 »). Ces cellules ont une capacité de produire de l'IL-10 suite à une stimulation antigénique et n'expriment pas Foxp3. Les cellules iNKT10 ne sont pas anergiques, mais elles conservent leur activité cytotoxique dépendante de l'antigène et prolifèrent après une deuxième stimulation avec α -GalCer. Par contre, une réduction de production des cytokines pro-inflammatoires a été observée. En utilisant des souris IL-10^{GFP}, une étude montre que les cellules iNKT10 sont enrichies dans le tissu adipeux (Sag et al., 2014) en n'y exprimant ni PLZF ni Foxp3. En fait, elles y jouent un rôle régulateur et protecteur dans le cas d'une inflammation induite par l'obésité. Ce phénotype régulateur est probablement dû à la production d'IL-10. Le facteur de transcription E4BP4, qui est connu pour réguler l'expression d'IL-10 par les lymphocytes Th1, Treg et iNKT, est exprimé par ces cellules. En effet, chez les souris E4BP4^{-/-}, les cellules iNKT ne produisent pas l'IL-10. De plus, elles interagissent avec les macrophages au « steady state » et après stimulation avec l'a-GalCer. Elles produisent l'IL-2 et l'IL-10, permettant de contrôler les lymphocytes Treg et de polariser les macrophages pro-inflammatoires $CD11c^+$ de type M1 en macrophages antiinflammatoires de type M2 $CD301^+$ (Lynch et al., 2015).

2.7.5 <u>Cellules iNKTFH</u>

Les cellules iNKT peuvent fournir de l'aide aux cellules B. Elles jouent un rôle important dans la production des anticorps pour la défense contre les infections par *Borellia hermsii* et *streptoccocus pneumoniae*. Elles sont probablement un partenaire des cellules de la zone marginale B dans la rate. Une étude montre que les cellules iNKT interagissent avec les cellules B présentant un antigène lipidique permettant la production d'IgG, laquelle est dépendante de l'IL-21 produite par les cellules iNKT (King et al., 2012).

Un second travail publié parallèlement à celui de Kien et coll. (2012) a identifié une population de cellules dénommées iNKTFH est capable d'induire l'activation des cellules B (Chang et al., 2012). Elles expriment Bcl-6, CXCR5, PD-1 et CD272 (BTLA). Bcl-6 joue un rôle important dans leur développement. De plus, CD28 est requis pour la formation des cellules iNKTFH et permet leur expansion. La formation des cellules iNKTFH, à l'inverse de celle des TFH, ne dépend pas de l'IL-21. Chez l'homme, 10% des cellules iNKT humaines expriment fortement CXCR5, PD-1 et CD57 (Chang et al., 2012).

2.8 Sous-populations $CD4^+$ et $CD4^-$ chez l'homme

Les cellules iNKT humaines sont classifiées en sous type $CD4^+$ et $CD4^-$. Il a été montré que plus de 90% des cellules iNKT présentes dans le thymus et dans le sang de cordon sont $CD4^+$ avec une localisation principale des cellules iNKT $CD4^-$ dans le sang périphérique et la rate. Une hétérogénéité d'expression de plusieurs marqueurs de surface est observée entre les cellules iNKT $CD4^+$ et $CD4^-$. A titre d'exemple, CD161, présent fortement sur les cellules iNKT du sang et de la rate, se trouve majoritairement exprimé par les cellules $CD4^$ comparativement aux cellules $CD4^+$, confirmant l'idée que CD161 est un marqueur de maturité et que le sous type $CD4^+$ comprend les précurseurs immatures (Chan et al., 2013). Plusieurs études ont montré que les cellules iNKT $CD4^+$ activées sont capables de produire à la fois des cytokines de type Th1 (IFN- γ , TNF- α) et de type Th2 (IL-4, IL-10, IL-13) tandis que les cellules $CD4^-$ ou DN sécrètent majoritairement des cytokines de type Th1 (IFN- γ , TNF- α) (Gumperz et al., 2002; Lee et al., 2002). Une étude de 2012 a mis en évidence que le profil de cytokines sur un temps prolongé de 16 heures de stimulation par PMA/ionomycine n'est pas identique à celui observé après 4 heures de la même stimulation. En effet, les cellules iNKT CD4⁺ produisent de fortes concentrations d'IFN- γ , de TNF- α , d'IL-4, d'IL-13, de GM-CSF et d'IL-2 par comparaison aux cellules iNKT CD4⁻ après une stimulation longue avec le PMA/ionomycine. En revanche, suite à une stimulation de 4 heures, le pourcentage des cellules produisant l'IFN- γ et le TNF- α est similaire entre les deux sous populations de cellules iNKT CD4⁺ et CD4⁻. Quoi qu'il en soit, la fréquence des cellules produisant l'IL-4 est significativement concentrée dans le sous type CD4⁺. Ces résultats suggèrent que les cellules CD4⁺ ont une plus forte propension à produire des cytokines après une longue stimulation comparativement aux cellules CD4⁻. Parmi la sous-population de cellules iNKT CD4⁺, celles exprimant CD62L sont considérées comme les plus productrice d'IL-4 et d'IL-13 avec une sécrétion d'IFN- γ comparable à celles de chacune des trois autres sous populations définies par les marqueurs CD62L et CD4 (Chan et al., 2013).

En 2002, une nouvelle sous population de lymphocytes iNKT humains CD4⁻ exprimant CD8 a été décrite. Elle est capable de produire l'IFN- γ à de fortes concentrations mais pas l'IL-4 en réponse à une stimulation par des DC provenant des monocytes chargés avec l' α -GalCer (Takahashi et al., 2002). Le marqueur CD56 des cellules NK est exprimé par un nombre significatif de cellules iNKT CD8⁺ et par une minorité des cellules iNKT CD4⁺ et DN. CD161 est présent sur la majorité des cellules CD8⁺ et DN mais à des fréquences très faibles sur les cellules iNKT CD4⁺ (O'Reilly et al., 2011).

2.8.1 Pouvoir cytotoxique des sous populations de cellules iNKT humaines

Le profil cytotoxique des cellules iNKT humaines diffère d'une sous population à une autre. En effet, les cellules iNKT DN et CD8⁺ expriment à des niveaux significatifs NKG2D tandis que les cellules iNKT CD4⁺ expriment FasL. L'expression des marqueurs des cellules NK tels que 2B4, CD94 et NKG2A est quasi exclusive des cellules iNKT DN et est faiblement décelée dans les cellules iNKT CD4⁺ (Chen et al., 2007; Gumperz et al., 2002; Lee et al., 2002; O'Reilly et al., 2011). La perforine est produite par les deux sous types de cellules iNKT selon le mode de stimulation utilisé. En effet, elle est libérée par les cellules iNKT CD4⁻ suite à une stimulation par l'IL-2 ou l'IL-12. En revanche, les cellules iNKT CD4⁺ stimulées par PMA/ionomycine et pas par l'IL-2 ou l'IL-12 sont capables de produire la perforine (Gumperz et al., 2002). Il a été montré que le sous type iNKT CD8⁺ présente une activité cytotoxique significativement élevée comparativement aux iNKT DN ayant un potentiel intermédiaire et aux iNKT CD4⁺. Cette activité est dépendante de l'expression de CD1d et de la dose employée d' α -GalCer. Une expression de CD107 n'est décelée qu'en présence de la molécule CD1d. L'addition d'une forte concentration d' α -GalCer (100 ng/ml) permet le triplement du niveau d'expression de CD107 (O'Reilly et al., 2011).

Par ailleurs, une étude de 2011 a montré que le mécanisme de cytotoxicité peut se produire d'une manière indépendante de CD1d et dépendante de NKG2D. En l'absence de CD1d, l'engagement de NKG2D des cellules iNKT avec un anticorps anti-NKG2D présent sur les cellules P815 déclenche une dégranulation par les cellules iNKT CD4⁻. Ces cellules sont capables de cibler les cellules K562 n'exprimant pas CD1d mais présentant les ligands de NKG2D (MICA, MICB, ULBP2 et ULBP4). Une localisation de NKG2D dans le site de contact avec la cible est observée avec une production de la perforine au niveau de la synapse immunologique (Kuylenstierna et al., 2011).

2.9 Preuve de l'implication des cellules iNKT durant l'immunosurveillance des cancers

L'importance des cellules iNKT dans la protection contre les cancers a pu être mise en évidence en se basant sur des expériences réalisées chez la souris ou bien encore sur des observations faites chez des patients atteints de cancers.

L'IL-12 joue un rôle important dans la protection contre le développement des tumeurs. Il a été montré que l'administration d'IL-12 active les cellules iNKT (V α 14), probablement y compris celles ayant un potentiel cytotoxique et inhibe les métastases dans un modèle de cancer hépatique induit par les cellules tumorales EL4 (Hashimoto et al., 1995; Takeda et al., 1996). L'IL-12 exerce bien ses effets anti-tumoraux *via* les cellules iNKT puisque chez des souris déficientes en iNKT (J α 18^{-/-}), l'IL-12 perd sa capacité à empêcher la survenue de métastases dans le modèle d'inoculation du mélanome B16. De plus, on restaure l'effet anti-métastatique de l'IL-12 chez des souris RAG^{-/-} V α 14^{tg} V β 8.2^{tg}, lesquelles sont déficientes en cellules iNKT pour exercer ses effets anti-tumoraux (Cui et al., 1997), ont été confirmés par l'étude de Shin et coll., montrant que l'IL-12 inhibe le développement tumoral hépatique chez les souris WT par comparaison aux souris J α 18^{-/-}. Une activité cytotoxique élevée contre les cellules de mélanome B16 a en effet été détectée par les cellules

iNKT provenant des souris WT injectées avec l'IL-12. De plus, le transfert adoptif des cellules iNKT provenant des souris WT traitées avec l'IL-12 chez des receveurs $J\alpha 18^{-/-}$ inhibe le développement tumoral et il n'y a pas d'inhibition de métastase quand les cellules injectées proviennent des souris donneuses RAG^{-/-} injectées avec l'IL-12. Ces résultats suggèrent que la présence des cellules iNKT et non des cellules NK traitées au préalable avec l'IL-12 est suffisante pour induire une activité anti-tumorale (Shin et al., 2001).

Une autre série d'arguments en faveur d'un effet protecteur des cellules iNKT repose sur l'emploi de son ligand α -GalCer dans sa capacité à prolonger le survie des souris injectées avec les cellules tumorales EL-4 et B16 (Kobayashi et al., 1995). Ainsi, les cellules iNKT sélectivement activées par l' α -GalCer inhibent le développement de métastases hépatiques en utilisant leur fonction cytotoxique (mécanisme NK-like) (Kawano et al., 1998). Il a été montré que les effets anti-tumoraux de l' α -GalCer passent principalement par l'activation des fonctions des cellules NK après la production d'IFN- γ par les cellules iNKT stimulées par l' α -GalCer augmente le nombre total des cellules mononucléées hépatiques et leur activité cytolytique *in vitro* contre les cellules tumorales de mélanome B16 ou de lymphome YAC-1. Cette activité est inhibée par la déplétion des cellules NK et NKT. L'injection d' α -GalCer augmente la production d'IFN- γ par les cellules iNKT qui est requise pour une meilleure action anti-tumorale non seulement des cellules NK mais aussi des cellules TCD8⁺ qui contribuent finalement à une prolongation de survie des souris et à l'inhibition de métastases tumorales hépatiques (Nakagawa et al., 2001).

Smyth et coll. (2000), ont apporté la démonstration *princeps* que les cellules iNKT protègent contre les tumeurs spontanées induites par MCA en l'absence d'un apport exogène d'IL-12 ou d' α -GalCer. En effet, la maladie se développe plus rapidement chez 70% des souris J α 18^{-/-} par comparaison à une bien plus faible fréquence chez les souris WT. Un rôle de l'IL-12 endogène a été décrit dans la réponse anti-tumorale car les souris IL-12p40^{-/-} comme les souris J α 18^{-/-} développent rapidement la maladie, comparativement aux souris WT. Les cellules iNKT après une stimulation *in vitro* par l'IL-12 sont capables de lyser les cellules de sarcome MCA-1 provenant de souris J α 18^{-/-} de manière dépendante de la perforine. Dans ce modèle, tant les cellules iNKT que les cellules NK contribuent directement à la protection contre le sarcome induit par le MCA comme le démontre le travail de Smith et al. (2001). En effet, les souris déplétées spécifiquement en cellules NK avec un anticorps anti-asialo-GM1 et les

souris $J\alpha 18^{-2}$ montrent une susceptibilité équivalente au développement de sarcome induit par MCA. De manière intéressante, l'administration d'IL-12 diminue significativement le développement de sarcome de façon dépendante des cellules NK et non des cellules iNKT. En effet, l'injection d'IL-12 à des souris déjà traitées avec l'anti-asialo-GM-1 perd son effet protecteur par comparaison aux souris WT (Smyth et al., 2001). Les travaux de cette équipe ont permis de proposer que l'implication respective des cellules iNKT et NK dépend de la biodisponibilité de l'IL-12 (Smyth et al., 2001, Crowe et al., 2002). En utilisant des souris $J\alpha 18^{-1-}$, l'étude de Crowe et coll. a confirmé le rôle essentiel des cellules iNKT et pas des cellules NK dans l'inhibition de développement de sarcome induit par MCA. Dans cette étude, il est important de relever que le transfert adoptif des cellules iNKT et non des cellules NK ou des cellules T conventionnelles est capable d'inhiber la croissance tumorale chez les souris J α 18^{-/-}. Un rôle essentiel de l'IFN- γ et pas de la perforine dans cette protection a été démontré. En effet, le transfert des cellules iNKT de souris déficientes en IFN-y chez les souris $J\alpha 18^{-/-}$ ne permet pas la prévention de sarcome tandis que celui des lymphocytes iNKT provenant de souris déficientes en perforine permet de conserver la capacité à inhiber le développement de tumeurs.

Par ailleurs, une étude de 2005 montre que la sous-population CD4⁻ et non CD4⁺ du foie et de la rate protège les souris J α 18^{-/-} du développement de sarcome induit par MCA. De la même façon, dans le modèle du mélanome induit par injection des cellules B16F10, le transfert adoptif des cellules iNKT CD4⁻ chez les souris J α 18^{-/-} suivi de deux injections d' α -GalCer empêche le développement de cancer. L'incapacité des cellules iNKT CD4⁺ ou CD4⁻ du thymus à inhiber le développement de cancer est due à leur production d'IL-4 qui contrecarre leur capacité à rejeter la tumeur dépendamment de l'IFN- γ . En effet, le transfert des cellules iNKT provenant de thymus des souris IL-4 KO protège du développement de mélanome chez les souris J α 18^{-/-} en augmentant la production d'IFN- γ après administration d' α -GalCer (Crowe et al., 2005).

Il est très difficile, du fait de son cadre d'étude observationnel, d'évaluer le rôle des cellules iNKT humaines dans l'immunosurveillance des cancers. Dans de nombreux cancers, Il a été décrit une réduction du nombre des cellules iNKT circulantes et/ou un déficit de leurs fonctions.

Chez les patients souffrant d'un myélome, une altération de la production d'IFN- γ des cellules iNKT en réponse à leur ligand l' α -GalCer a été observée (Dhodapkar et al., 2003) tandis que

chez les patients atteints de cancer de prostate, c'est à la fois leur nombre et leur fonctions (expansion et production de cytokines en réponse à une stimulation *ex vivo* avec l'α-GalCer) qui sont apparues altérées (Tahir et al., 2001).

Chez les patients souffrant d'un carcinome squameux du cou et de la tête, une diminution numérique des cellules iNKT associée à un mauvais pronostic a été mise en évidence (Molling et al., 2007). De manière similaire, dans le carcinome colorectal, les patients ayant une infiltration de cellules iNKT plus importante ont une faible incidence de métastase (Tachibana et al., 2005). Dans ce cancer, des cellules iNKT infiltrant la tumeur avec un statut de cellules activées (CD69⁺) ont été mises en évidence. Fait important, ces cellules possèdent un arsenal cytotoxique comme l'atteste leur expression de CD178 (pour « FasL ou CD95L ») et de granzyme B.

L'ensemble de ces données révèle un rôle important des cellules iNKT contre la croissance des cancers, y compris chez l'homme. Cette conclusion a pu être récemment étayée par la création de modèles de souris humanisées, lesquels ont permis de mieux comprendre le rôle des cellules iNKT humaines dans l'immunosurveillance des cancers.

Ainsi, en 2013, l'équipe de Yuan, en générant des souris « hCD1d KI », a montré que le CD1d humain (hCD1d) peut présenter l' α -GalCer aux cellules iNKT pour inhiber le développement de mélanomes induits par des cellules B16. Dans ce modèle, les auteurs montrent que les souris hCD1d KI ont une fréquence et un ratio CD4⁺/DN de cellules iNKT similaires à ceux observés habituellement chez l'homme. Comparativement aux souris WT, on observe chez les souris hCD1d KI une augmentation de la production d'IFN- γ et non de l'IL-4 12 heures après administration *in vivo* d' α -GalCer (Wen et al., 2013).

En 2015, la même équipe a généré un autre modèle de souris dénommé « hCD1d-V α 24tg » en introduisant le transgène humain V α 24J α 18 chez les souris hCD1d KI déficientes en cellules iNKT murines. Ces souris développent une sous-population de cellules iNKT CD8 $\alpha\beta^+$ similaire à celle existant chez l'homme. Ces cellules ont un phénotype mémoire avec 16% d'entre-elles produisant de l'IFN- γ en réponse à une stimulation par PMA/ionomycine contre 3 à 6% des cellules DN ou CD4⁺. De plus, des expériences de co-culture de cellules cibles de mélanome B16F10 marquées avec le CFSE en présence de l' α -GalCer avec les différentes sous-populations de cellules iNKT triées ont montré le potentiel cytotoxique élevé des cellules iNKT CD8⁺ par comparaison aux cellules iNKT DN ou CD4⁺. Ainsi, après co-culture

avec les cellules dendritiques chargées avec α -GalCer, les cellules iNKT CD8⁺ expriment des niveaux élevés de perforine comparativement aux cellules iNKT DN et CD4. Finalement, la co-administration chez des souris receveuses hCD1d-KI-J α 18KO de cellules B16F10 avec des splénocytes provenant de souris hCD1d-V α 24tg permet de prévenir le développement de métastases pulmonaires chez ces souris en présence d' α -GalCer (Wen et al., 2015).

A l'inverse de ce qui a été montré dans les cancers solides, les cellules iNKT pourraient inhiber la réponse anti-tumorale dans des modèles de lymphome chez la souris. Une étude de 2012 montre que seules les souris Jα18^{-/-} présentent une diminution de développement de lymphome B induit par la transplantation de lignées tumorales portant l'oncogène Myc. Cet effet était dû à une amélioration de l'activité des cellules T CD8⁺ anti-tumorales en l'absence de cellules iNKT, laquelle pouvait être inhibée après reconstitution des souris Jα18^{-/-} avec des cellules iNKT. De plus, le traitement avec l'α-GalCer de souris WT transplantées par les lignées tumorales réduisait le nombre des cellules T CD8⁺ spécifiques de tumeurs (Bjordahl et al., 2012). Par ailleurs, dans un modèle murin de lymphome T induit par les lignées RMA transfectées avec CD1d, les auteurs ont montré que les souris Jα18^{-/-} inoculées avec les lignées RMA-CD1d survivent significativement plus longtemps que les souris WT. Ces observations montrent l'implication des cellules iNKT dans l'inhibition de l'activité anti-tumorale. Ce résultat pourrait être expliqué par l'observation que les souris WT injectées avec les RMA-CD1d produisent des quantités importantes d'IL-13 tandis que les souris Jα18^{-/-} expriment fortement les cytokines pro-inflammatoires IFN-γ et GM-CSF (Renukaradhya et al., 2006).

2.10 Fonctions effectrices anti-tumorales des cellules iNKT

2.10.1 Effet indirect des cellules iNKT par modulation de la production des cytokines

L'engagement du TCR des cellules iNKT avec le complexe CD1d/antigène glycolipidique permet l'activation des cellules iNKT et la production d'une variété de cytokines tant de type Th1 comme le TNF- α (pour « *Tumor Necrosis Factor-\alpha* »), l'IL-2 et l'IFN- γ , que de type Th2 comme l'IL-5, l'IL-13 ou l'IL-4 ainsi que des cytokines immunosuppressives telles que l'IL-10 et le TGF- β . Elles sont capables aussi de produire des chimiokines comme RANTES, l'éotaxine, MIP1 α et MIP1 β (Matsuda et al., 2008). La réponse des cellules iNKT est dépendante de la nature du glycolipide présenté. A titre d'exemple, la stimulation des cellules iNKT par l' α -GalCer provoque une production d'IFN- γ alors que la stimulation par OCH (un analogue synthétique de l'a-GalCer modifié au niveau de la chaîne lipidique) induit la production d'IL-4. Par ailleurs, la reconnaissance du complexe CD1d/antigène par le TCR des cellules iNKT permet non seulement la production des cytokines mais aussi augmente l'expression de CD154 par ces cellules. La liaison de CD40 exprimé par les CPA (cellules présentatrices d'antigènes) et le CD154 par les cellules iNKT joue un rôle essentiel dans la surexpression des marqueurs de maturation des DC (CD80 et CD86) amplifiant ainsi la production d'IFN-y par les cellules iNKT (Fujii et al., 2003). Ainsi, la DC mature produit l'IL-12 induisant la production d'IFN-γ. De plus, la maturation des DC permet l'activation des cellules T CD8⁺ et la formation des cellules mémoires spécifiques des antigènes tumoraux. La production spontanée d'IFN-y par les cellules iNKT conduit à l'activation et la prolifération des cellules NK ainsi qu'à leur sécrétion d'IFN-γ. La combinaison des cytokines IL-12 et IFN-y augmente l'expression des récepteurs de mort CD178 et CD253 (pour «TRAIL») par les cellules NK et les cellules T CD8⁺. Ces événements séquentiels sont importants dans la réponse anti-tumorale des cellules iNKT. En effet, l'injection de l'a-GalCer chez des souris WT permet une activation des cellules NK produisant l'IFN- γ et exprimant CD69 en mettant en jeu un mécanisme dépendant de la voie CD1d/NKT (Carnaud et al., 1999) (Figure 5a).

2.10.2Effet indirect des cellules iNKT en modulant le microenvironnement tumoral

La croissance tumorale est dépendante des facteurs solubles et des signaux obtenus dans le microenvironnement tumoral provenant de communications entre les cellules tumorales, les infiltrats lymphocytaires et les cellules stromales. Les cellules iNKT pourraient réguler la croissance tumorale en agissant directement sur le microenvironnement tumoral. En effet, les cellules iNKT ciblent les TAM CD68⁺ exprimant CD1d. Ces cellules promeuvent la croissance tumorale *via* la production d'IL-6 dans le cas d'un cancer de prostate ou de neuroblastome (Song et al., 2009). Par ailleurs, il a été montré que les cellules iNKT interagissent d'une manière dépendante de CD1d et de CD40 avec les cellules MDSC (pour « *myeloïd-derived suppressor cells* »). Ces cellules T due à l'expression de NOS2 et d'ARG1. Le transfert adoptif des cellules iNKT supprime l'activité des cellules MDSC chez des souris infectées avec le virus IAV (Influenza A) permettant ainsi la restauration de la réponse

immunitaire spécifique d'IAV et l'augmentation de la survie des souris (De Santo et al., 2008). De plus, dans le microenvironnement tumoral, les MDSC et les neutrophiles produisant l'IL-10 constituent des cibles potentielles des cellules iNKT qui interagissent avec elles de manière dépendante de CD1d et de CD40, entraînant la réversion de leur phénotype suppresseur **(Figure 5b)** (De Santo et al., 2010).

2.10.3 Effet cytotoxique direct des cellules iNKT

Comme nous l'avons évoqué, les cellules iNKT jouent un rôle essentiel dans l'élimination des cellules tumorales d'une manière dépendante de CD1d. Par ailleurs, il a été montré que NKG2D, présent à la surface des cellules iNKT, pourrait interagir avec son ligand exprimé par les cellules tumorales ou en stress permettant de stimuler la fonction cytotoxique des cellules iNKT (Kuylenstierna et al., 2011). A l'image des cellules NK, les cellules iNKT possèdent un arsenal cytotoxique. Elles sont capables d'exprimer la perforine, des granzymes, les molécules CD178 et CD253 permettant de lyser directement leur cible. Il a été montré que le blocage de la présentation antigénique dépendant de CD1d diminue l'expression de perforine par les cellules iNKT *in vitro* (Figure 5c) (Altman et al., 2015).



Figure 5 : Rôle des cellules iNKT dans la réponse anti-tumorale. (a) Effet indirect des cellules iNKT dans l'élimination des cellules tumorales (TCs) à travers l'activation des différents effecteurs du système immunitaire **(b)** Modulation de microenvironnement tumoral par les cellules iNKT **(c)** Lyse des cellules tumorales via l'engagement de TCR ou de NKG2D.D'après Altman et al., 2015).

2.11 Les cellules T CD8⁺ mémoires non conventionnelles

2.11.1 Mise en évidence chez la souris de Lymphocytes T CD8⁺ « innatememory »

Une population nommée T CD8 « innate memory » (IMP, pour « innate memory phenotype ») présentant des caractéristiques innées par l'expression d'un phénotype mémoire dès le stade thymique indépendamment d'une stimulation antigénique exogène a été décrite chez des souris déficientes en tyrosine kinase de la famille Tec (pour « Tyrosine Kinase expressed in hepatocellular carcinoma), Itk (pour « inductible T cell kinase »)^{-/-}, et/ou Rlk (pour « Resting lymphocytes kinase ») ^{-/-} intervenant dans la transduction du signal à travers le TCR. Ces souris présentent des anomalies importantes de la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ conventionnels liés à un défaut de la sélection positive (Atherly et al., 2006; Broussard et al., 2006). Précisément, dans le fond Itk^{-/-}, la diminution des

lymphocytes T est compensée par une augmentation du nombre des cellules T CD8⁺ dans le thymus, la rate et les ganglions lymphatiques. Il a été montré qu'environ 60 à 70% des lymphocytes T CD8⁺ dans le thymus expriment NK1.1 (marqueur des cellules NK chez la souris), des marqueurs des cellules T mémoires ou activées comme le CD44 et le CD122 (la chaîne β du récepteur de l'IL-2, commune avec le récepteur de l'IL-15). Elles expriment aussi des marqueurs d'activation tels que le CD25 (la chaîne α du récepteur de l'IL-2) et le CD69 (Horai et al., 2007; Hu et al., 2007; Liao and Littman, 1995). De plus, ces cellules expriment le récepteur de chimiokine CXCR3 qui est un marqueur des lymphocytes T mémoires chez la souris et qui est associé à la migration des lymphocytes T dans les tissus inflammatoires. Enfin, ces cellules présentent une expression forte de la chaîne α du récepteur de l'IL-4 (IL-4R α) (Weinreich et al., 2010). Les lymphocytes T CD8⁺ IMP, dans le thymus, produisent avec une fréquence élevée l'IFN- γ en réponse à une stimulation *in vitro* par le PMA-ionomycine. Ils sont capables aussi de produire l'IFN- γ *in vitro* en réponse à une combinaison des cytokines pro-inflammatoires IL-12 et IL-18 (Broussard et al., 2006; Hu et al., 2007; Liao and Littman, 1995).

La définition de ces cellules se base aussi sur l'expression du facteur de transcription Eomes (pour *« Eomesodermine »*) qui est un membre de la famille des facteurs de transcription T-box ayant de fortes homologies avec le facteur de transcription T-bet. D'une manière intéressante, les cellules T CD8⁺ IMP chez les souris Itk^{-/-} présentent une expression homogène d'Eomes dans le thymus, la rate et les ganglions. En absence d'Eomes, les cellules CD44⁺CD122⁺ ne sont pas détectables (Sosinowski et al., 2013; Zhou et al., 2010). Cela suggère qu'Eomes est un élément critique de la différentiation des cellules T CD8⁺ IMP. Il a été montré que l'IL-15 joue un rôle important dans la différenciation et l'expansion des cellules T CD8⁺ IMP.

Il faut noter que cette population est présente chez les souris déficientes en Klf2 qui est un facteur de transcription impliqué dans la régulation de la migration des lymphocytes T, en Id3 qui est impliqué dans la prolifération et la différenciation cellulaire ou chez les souris portant une mutation ponctuelle dans SLP76 impliqué dans la transduction du signal du TCR (Gordon et al., 1987; Weinreich et al., 2010). De manière intéressante, l'étude de Weinreich et al. de 2010 montre l'existence de cellules ayant des critères phénotypiques proches de ceux des cellules T CD8⁺ IMP non seulement dans le thymus mais aussi dans la rate. La même observation a été décrite dans la rate chez les souris Itk^{-/-} avec des cellules ayant les mêmes caractéristiques fonctionnelles et phénotypiques. En effet, les cellules T CD8⁺ IMP spléniques

expriment l'IFN- γ à des pourcentages plus élevés que les thymocytes T CD8⁺ IMP en réponse à une stimulation par PMA/calcium ionophore. Toutes ces données suggèrent l'existence d'une population T CD8⁺ non conventionnelle dans les organes périphériques et leur lien avec les cellules T CD8⁺ IMP thymiques.

2.11.2Les cellules T CD8⁺ « virtual-memory » VM

Plusieurs équipes ont mis en évidence la présence de cellules T CD8⁺ en périphérie ayant un phénotype mémoire sans stimulation antigénique similaire à celui des cellules T CD8⁺ IMP thymiques. Ces cellules, qui ont été dénommées VM (pour « *virtual memory* ») partagent plusieurs caractéristiques avec les lymphocytes T CD8⁺ IMP (Rudd et al., 2011a, 2011b). Elles expriment le facteur de transcription Eomes qui est considéré comme un marqueur phénotypique majeur des cellules T CD8⁺ VM/IMP du fait que ces deux types cellulaires chez les souris Eomes^{-/-} sont absents. De plus, l'IL-15 joue un rôle critique dans l'expansion et l'homéostasie de la population T CD8⁺ VM comme le montre le faible nombre de cellules T CD8⁺ VM chez les souris CD122^{-/-} (Sosinowski et al., 2013). A la différence des cellules T CD8⁺ IMP, les cellules T CD8⁺ VM n'expriment pas le CD49d, une α 4-intégrine exprimée spécifiquement par les cellules mémoires CD8 différenciées après une stimulation antigénique. NKG2D et la chimiokine CCL5 permettent de discriminer les lymphocytes T CD8⁺ VM (NKG2D⁺ CCL5⁺) (Haluszczak et al., 2009; Mbitikon-Kobo et al., 2009; Ventre et al., 2012).

2.11.3Les Facteurs impliqués dans la différenciation des lymphocytes T <u>CD8⁺IMP/VM</u>

✤ IL-4 et PLZF

Plusieurs études ont montré le rôle de l'IL-4 dans le développement des cellules IMP. Chez les souris double-déficientes *IL-4-Ra^{-/-}Id3^{-/-}*, *IL-4-Ra^{-/-}Klf2-^{/-}* ou *IL-4-Ra^{-/-}Itk^{-/-}*, les cellules T CD8⁺ ne produisent pas l'IFN- γ et n'ont pas de phénotype IMP, comme l'atteste leur non acquisition du marqueur transcriptionnel Eomes. Ces observations montrent que la différenciation des cellules T CD8⁺ IMP est dépendante de l'IL-4. De plus, les souris déficiente en stat6, l'élément clé de la transduction du signal du récepteur de l'IL-4, ont un défaut de génération des cellules T CD8⁺ IMP (Huang et al., 2014; Prince et al., 2014; Verykokakis et al., 2010; Weinreich et al., 2010).

De même, l'IL-4 joue un rôle important dans le développement des cellules T CD8⁺ VM, montré par l'absence de cette population chez les souris *IL-4-R* $\alpha^{-/-}$ ou *Stat6^{-/-}*. De plus, l'apport exogène de l'IL-4 augmente sensiblement l'expression d'Eomes par l'ensemble des cellules T CD8⁺ mémoires et plus particulièrement les cellules T CD8⁺ IMP. Une diminution de la fréquence de ces cellules est observée en utilisant un anticorps bloquant l'IL-4 (Akue et al., 2012; Gordon et al., 2011; Huang et al., 2014; Sosinowski et al., 2013; Ventre et al., 2012). Notons cependant une série d'études qui suggère l'existence d'autres mécanismes indépendants de l'IL-4 et de son récepteur dans la génération des cellules T CD8⁺ VM. Ainsi, chez les souris C57BL/6 *IL-4-R* $\alpha^{-/-}$, une diminution de 25 à 40% des splénocytes T CD8⁺ VM par comparaison aux souris sauvages) contre moins de 1% des thymocytes T CD8⁺ gardant un phénotype IMP (Akue et al., 2012; Sosinowski et al., 2013; Weinreich et al., 2010).

S'agissant des sources cellulaires d'IL-4 mises en jeu dans la différenciation des cellules T CD8⁺ IMP/VM, une série de travaux ont apporté des arguments suggérant que les lymphocytes iNKT constituent une source majeure. Cette fonction des cellules iNKT est liée à l'expression de PLZF au cours de leur différenciation et des études ont bien montré un défaut de différenciation des cellules T CD8⁺ IMP dans les différents modèles de génération des cellules T CD8⁺ IMP (souris Klf2^{-/-}, CBP^{-/-}, Id3^{-/-} et SLP76^{Y145F}) dans des fonds génétiques CD1d^{-/-} et PLZF^{lu/lu}/PLZF^{-/-} (Verykokakis et al., 2010; Weinreich et al., 2010). Cependant, l'étude de Weinreich propose aussi un rôle de la population $\gamma\delta$ -NKT PLZF⁺ dans le contrôle de la différenciation des cellules T CD8⁺ IMP du fait que les souris déficientes en Itk présentent un défaut de la différenciation des lymphocytes iNKT. Cette hypothèse qui était basée sur le fait que les cellules γδ-NKT étaient augmentées en nombre chez ces souris et qu'elles exprimaient PLZF par le biais de l'IL-4 a été remise en question par l'utilisation de souris δ' (souris TCR- δ déficientes et donc dépourvues de lymphocytes T TCR- $\gamma\delta$) dans un fond $Itk^{-/-}$. En effet, ces souris n'ont pas de modification de nombre des cellules T CD8⁺ IMP par comparaison à des souris $Itk^{-/-}$. De plus, dans un fond $J\alpha l\delta^{-/-}$ ou $CDld^{-/-}$, il n'y a pas de défaut de génération de lymphocytes T $CD8^+$ IMP chez les souris $Itk^{-/-}$. Une population de lymphocytes non iNKT et exprimant PLZF pourrait donc contribuer, au moins en partie, à l'expression de l'IL-4 nécessaire à la différenciation des cellules T CD8⁺ IMP. De plus, la génération de ces cellules dépend de la mise en jeu de SAP, un élément de transduction nécessaire à l'expression de PLZF et de l'IL-4 (Huang et al., 2014; Prince et al., 2014).

L'étude des fonctions des cellules T $CD8^+$ IMP en situation physiopathologique est encore mal documentée. On retiendra cependant deux études montrant le rôle des cellules T $CD8^+$ IMP dépendantes de l'IL-4 dans le contrôle d'une infection virale. La première étude utilise des souris WT de fond BALB/c, soit un fond génétique associé à une plus forte fréquence de cellules T CD8 IMP induite par IL-4 que le fond C57Bl/6 (Renkema et al., 2016). La seconde étude utilise un modèle transgénique CIITA (CIITA^{tg}) qui a l'avantage de posséder dans le fond C57Bl/6 un nombre élevé de cellules T CD8⁺ IMP (Eomes⁺CXCR4⁺IL-4R α ⁺CD122⁺) qui dépendent de l'IL-4 produite par les cellules T CD4⁺ exprimant PLZF (Lee et al., 2015). Dans les deux modèles, en réponse à une infection par LCMV, on peut identifier un pool de cellules T CD8⁺ IMP spécifiques de LCMV dont la génération dépend de l'IL-4. Chez les souris IL-4^{KO}, après infection par LCMV, leur nombre est très réduit et s'accompagne d'une charge virale considérablement augmentée.

2.11.4 Lymphocytes T CD8⁺ innés chez l'homme

Des données ont montré l'existence probable des cellules T CD8⁺ IMP/VM chez l'homme. Une étude de 2012 a montré l'existence d'une population T CD8⁺ Kir⁺ ayant un phénotype de type EMRA (CD45RA⁺CCR7⁺CD57⁺). Ces cellules répondent moins bien à une stimulation du TCR par rapport aux cellules T CD8⁺ Kir⁻ lorsque l'on considère l'expression de l'IFN- γ , du TNF- α et la dégranulation évaluée par un marquage CD107a (Björkström et al., 2012). De plus, une équipe en 2006 a montré l'existence dans le sang de cordon d'une population T CD8⁺ Kir⁺ de phénotype mémoire de type EMRA (pour «*Effector Memory CD45RA*») capable de synthétiser l'IFN- γ . Ces résultats sont obtenus sur du sang placentaire présumé dépourvu de toute stimulation antigénique exogène causée par une pathologie placentaire ou infection virale, ce qui est en faveur d'une origine innée de ces cellules (Warren et al., 2006). Il existe aussi des cellules T CD8⁺ Eomes⁺ à des fréquences variables dans le thymus, la rate fœtale et dans le sang de cordon. Ces cellules expriment CD45RA, CD161 et CD122 et sont capables de produire l'IFN- γ après stimulation (Min et al., 2011).

3. <u>Les cellules dendritiques, des partenaires privilégiés</u> <u>des lymphocytes iNKT</u>

3.1 Définition des cellules dendritiques (DC)

Les DC sont des cellules présentatrices d'antigène (CPA), essentielles pour l'initiation et la mise en place des différents acteurs impliqués dans la réponse immunitaire anti-tumorale. Elles représentent le lien crucial entre l'immunité innée et l'immunité adaptative en jouant un rôle central dans l'activation des lymphocytes T et leur différenciation en cellules T helper ou en cellules T cytotoxiques.

Les DC expriment à leur surface des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) dont le principal rôle est la présentation des antigènes de type protéique ou lipidique aux lymphocytes T. Il existe deux classes de molécules du CMH (système HLA chez l'homme et H-2 chez la souris) : CMH de classe I et CMH de classe II qui différent par leur fonction et par le type d'antigène protéique présenté. D'autres molécules qui ont une structure similaire aux molécules de classe I du CMH et dénommées CD1 sont spécialisées dans la présentation des antigènes lipidiques. Les DC jouent le rôle de sentinelles dans la circulation sanguine et les tissus où elles ont la capacité de capturer, de dégrader et d'apprêter les antigènes par les molécules de CMH (pour revue générale Banchereau et al., 2000).

3.2 Fonctions classiques des DC

Le développement des modèles de différenciation des DC *in vitro* à partir des cellules hématopoïétiques ou des monocytes circulants a permis d'étudier et de comprendre les fonctions des DC. La différenciation des cellules souches hématopoïétiques CD34⁺ dans la moelle osseuse donne naissance à des précurseurs lymphoïdes CLP (pour « *common lymphoïd Progenitor »*) et des précurseurs myéloïdes CMP (pour « *common myeloïd Progenitor »*). Chez la souris, les MDP (pour « *macrophage-DC Progenitor »*) provenant des CMP se séparent en donnant naissance à des monocytes et à des CDP (pour « *common-DC Progenitor »*). Les CDP vont générer des précurseurs des DC (pré-DC) qui deviendront DC myéloïdes (aussi dénommées conventionnelles) et des DC plasmacytoïdes (ou pDC).

Chez l'homme, on sait que les pré-DC et les pDC proviennent probablement d'un précurseur commun des DC mais la présence des CDP n'a pas jusqu'aujourd'hui été mise en évidence. Les pré-DC présents dans la moelle osseuse migrent dans le sang. Ils donnent naissance à plusieurs types de DC myéloïdes qui sont localisés dans les organes lymphoïdes comme la rate et les ganglions lymphatiques (DC résidentes) et dans les organes non lymphoïdes tels que l'intestin, le rein, et le foie (DC migratoires). Nous distinguons deux types de DC myéloïdes conventionnelles Flt3⁺ : une population minoritaire identifiée par CD141 (BDCA3)⁺ CLEC9A⁺, une autre majoritaire exprimant CD11c (BDCA1)⁺ CD11b⁺. Les DC humaines exprimant CD11c présentent probablement des homologies avec les DC CD11b⁺ murines (Pour revues générales, Dalod et al., 2014; Liu and Nussenzweig, 2010; Watowich and Liu, 2010). La capture des antigènes et l'apprêtement se fait dans les tissus par les DC immatures alors que les DC matures présentes dans les zones T des organes lymphoïdes sont spécialisées dans la présentation de complexe CMH/antigène aux cellules T.

Dans la suite de cette partie de notre introduction générale, nous détaillerons les fonctions des DC myéloïdes immatures et matures.

3.3 Reconnaissance des antigènes par les DC

Les DC présentes dans les tissus périphériques en contact direct avec les pathogènes comme la peau et les muqueuses sont principalement des DC immatures. Elles disposent d'une capacité élevée à capturer les antigènes, mais elles ne sont pas capables d'activer les lymphocytes T. Elles reconnaissent les microbes, des molécules associées aux pathogènes, les PAMPs (pour « *Pathogen-Associated Molecular Patterns »*) grâce à des récepteurs dénommés PRRs (pour « *Pattern Recognition Receptors »*). Il existe plusieurs types de ces récepteurs : les TLRs (pour « *Toll like Receptors »*), les CLRs (pour « *C-type lectin receptors »*) et les NLRs (pour « *intracytoplasmic Nucleotide Oligomerization domain (NOD)-like receptors »*).

3.3.1 <u>TLRs</u>

Les TLRs identifiés par analogie avec les récepteurs *Toll* présents chez la drosophile sont exprimés par une grande variété de cellules. Dix TLRs ont été découverts chez l'homme et treize chez la souris. Ils peuvent être divisés en plusieurs familles selon les ligands fixés et la localisation cellulaire. Ainsi, les TLRs 1, 2, 4 et 6 sont exprimés à la surface cellulaire et

reconnaissent des lipides, alors que les TLRs 3, 7, 8 et 9 sont présents dans des compartiments intracellulaires (Endosome tardif-lysosome) et fixent des acides nucléiques (Heil et al., 2003; Matsumoto et al., 2003). Par ailleurs, chez l'homme, l'expression des TLRs est différente entre les sous-populations des DC. En effet, les pDC expriment les TLRs 2, 6, 7, 9 et 10 tandis que les DC myéloïdes expriment les TLRs 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 et 10.

Différent TLRs peuvent reconnaître différents PAMPs induisant l'activation de différentes voies de signalisation et conduisant à un profil spécifique d'expression de gènes. Par exemple, les lipopolysaccharides (LPS) d'*Escherichia coli* stimulent les DC en se fixant sur TLR4 induisant la production de l'IL-12 nécessaire pour une réponse Th1. Par contre, le complexe LPS (*Porphyromonas gingivalis*)/TLR2 induit l'activation des DC et la production d'IL-10 (Pulendran et al., 2001). En fonction de l'agent infectieux fixé, les TLRs déclenchent des signaux distincts permettant différents états d'activation des DC (Kapsenberg, 2003; Takeda et al., 2003; Ueno et al., 2007).

3.3.2 <u>CLRs</u>

Les CLRs sont des molécules qui se fixent sur la partie carbohydrate des glycoprotéines. A l'image des TLRs, différents types de CLRs sont exprimés par les différentes populations de DC. A titre d'exemple, BDCA-2 (pour *« Blood DC Antigen 2 »*) est spécifique des pDC, tandis que la Langerin/CD207 est exprimée par les cellules de Langerhans. Les CLRs servent d'ancrage des pathogènes (virus, bactérie, parasites) permettant leur internalisation. De plus, les CLRs jouent le rôle de molécules d'adhésion entre les DC et les autres types cellulaires. Ainsi, DC-SIGN permet l'interaction des DC avec la molécule Mac-1 exprimée à la surface des neutrophiles, ces derniers produisent du TNF- α qui est essentiel à l'activation des DC (Figdor et al., 2002; van Gisbergen et al., 2005).

3.3.3 <u>NLRs</u>

Cette famille de récepteurs reconnait des composants intracellulaires des microbes et contient 22 membres. La reconnaissance des PAMPs par les NLRs déclenche une cascade de signalisation conduisant à la production des cytokines pro-inflammatoires. Les NLRs sont des composants de l'inflammasome, un complexe multiprotéique qui joue un rôle important dans l'activation des caspases proinflammatoires et par conséquent dans la sécrétion de l'IL-1 β et de l'IL-18. L'expression de NLRs par dans les DC humaines est peu connue. NOD1/2 est exprimé dans le cytosol des macrophages et des DC (Ueno et al., 2007)

3.4 Capture des antigènes par les DC immatures

Après contact avec les pathogènes, les DC immatures localisées dans l'ensemble des tissus non lymphoïdes sont capables de capturer les antigènes (pathogènes, cellules infectées, cellules mortes) dans le but de les présenter efficacement aux lymphocytes T. Pour cela, elles utilisent plusieurs mécanismes qui comprennent l'endocytose, la pinocytose et la phagocytose.

L'*endocytose* consiste à capturer des macromolécules en passant par des récepteurs situés dans des régions de la membrane plasmique dénommés « puits recouverts ». Au cours de ce processus, les antigènes se lient sur des récepteurs membranaires qui, *via* leur partie intracytoplasmique, déclenchent le recrutement d'un réseau de clathrines qui permet la formation d'une structure vésiculaire. On distingue plusieurs récepteurs d'endocytose appartenant à différentes familles : les récepteurs de type lectine (DEC-205, récepteur au mannose), récepteurs au fragment Fcγ des IgG de type I (CD64) ou II (CD32) (Banchereau et al., 2000; Jiang et al., 1995; Tan et al., 1997).

Les antigènes qui ne se lient pas à la surface cellulaire *via* des récepteurs sont pris par *pinoctose*. C'est une forme d'endocytose permettant à la cellule d'absorber des vésicules ou des gouttelettes, de filtrer le milieu extracellulaire et de capturer des substances solubles même si elles sont présentes en faible quantité. L'absorption de la phase liquide peut se produire par l'intermédiaire de mécanismes distincts : la *micropinocytose* qui permet l'absorption de petites vésicules de l'ordre de 0.1 μ m qui peut se produire dans toutes les cellules ; la *macropinocytose* qui est limitée à quelques types cellulaires comprenant les macrophages, les cellules épithéliales et les DC, transporte des gouttelettes d'environ 0.5-3 μ m utilisant l'actine et la formation de larges vacuoles intracellulaires (Banchereau et al., 2000; Sallusto et al., 1995).

Un autre mécanisme est la *phagocytose*, lequel est généralement utilisé par la DC pour capturer toutes les sortes de bactéries gram⁻ et gram⁺ ainsi que des myobactéries. De plus, des fragments de cellules mortes par apoptose ou par nécrose sont capturés par phagocytose nécessitant l'implication du récepteur CD36 ou des intégrines telles que $\alpha\nu\beta3$ et $\alpha\beta5$. Par ailleurs, la phagocytose permet aussi la capture des parasites comme *Leishmania major* (Banchereau et al., 2000).

3.5 Maturation des DC

Les DC immatures expriment faiblement les molécules de CMH et les molécules de costimulation CD80/86. En revanche, ces cellules sont capables de capturer les pathogènes d'une manière efficace. En réponse à un pathogène, les DC suivent un programme de maturation entraînant une activation et une expansion clonale des LT naïves spécifique d'antigène et par conséquent leur différenciation en cellules T effectrices. La ligation du PRR avec les DAMPs ou les PAMPs joue un rôle important dans la maturation des DC. Trois voies majeures de signalisation sont activées par les TLRs permettant une activation des DC : mitogen-activated protein kinase (MAPK), nuclear factor-kB (NF-kB) et interferon regulatory factors (IRF) (Akira et al., 2006). Un certain nombre de TLR utilise des molécules adaptatrices comme MYD88, TRIF, TRAM, TIRAP. Tous les TLRs, à l'exception de TLR3, utilisent MYD88 pour déclencher l'activation de TAK1, laquelle est responsable de l'activation de MAPK et de NF-kB aboutissant à la production des cytokines proinflammatoires TNFa, IL-12 et IL-6. Ces cytokines jouent un rôle important dans l'activation des DC et in fine dans la polarisation des cellules T. Il a été montré que TAK1 est essentiel pour le maintien en survie et la maturation des DC. En effet, les souris déficientes en TAK1 présentent des défauts dans le développement et les fonctions des DC (Wang et al., 2012). TLR3 et TLR4 recrutent l'adaptateur TRIF qui active TBK1 (TANK-binding kinasel) et la kinase IkB, lesquelles activent à leur tour IRF3 et aboutissant à l'expression d'IFN-I. Ces deux derniers jouent un rôle important dans la production d'IL-12 par les DC et la polarisation Th1 (Dalod et al., 2014; Hemmi et al., 2004).

Les cytokines et les chimiokines libérées après l'association des pathogènes aux PRRs amplifient la réaction inflammatoire et recrutent d'autres cellules. En fonction des interactions et du microenvironnement cytokinique, l'étape de maturation des DC se met en place, permettant l'induction des différentes réponses lymphocytaires T. Ces étapes de maturation s'accompagnent de changements phénotypiques et fonctionnels permettant aux DC de migrer dans les ganglions où elles présentent les antigènes aux lymphocytes T. La maturation diminue les capacités des DC de capture des antigènes ainsi que de phagocytose/endocytose. Cet événement est coordonné avec une réorganisation de structure et du cytosquelette et une acquisition d'une grande mobilité cellulaire (Winzler et al., 1997). Une surexpression des molécules de CMH de classe I et II, des molécules de costimulation CD80/86, CD40 et des

molécules d'adhérence CD54 (ICAM-1) et CD58 (LFA-1) est associée à l'étape de maturation des DC (Trombetta and Mellman, 2005).

3.6 Migration des DC

Après capture des antigènes, les DC présentes dans les tissus périphériques migrent dans les organes lymphoïdes secondaires afin de présenter les antigènes aux lymphocytes T. La maturation des DC est suivie d'un changement d'expression de leurs récepteurs aux chimiokines permettant leur migration de la périphérie vers les ganglions lymphatiques.

Les facteurs impliqués dans la maturation des DC tels que l'IL-1, le TNF- α et le LPS jouent un rôle important dans l'expression des chimiokines nécessaires à la migration. Il a été montré que le traitement des souris avec des anticorps neutralisants l'IL-1 ou le TNF- α affecte la mobilisation des DC. La maturation des DC est associée à une augmentation d'expression du récepteur CCR7. Ce dernier permet la migration des DC en répondant aux chimiokines inflammatoires CCL9 et CCL21, ligands de CCR7 et qui sont exprimés respectivement par la partie liminale des cellules endothéliales et par les cellules T des organes lymphoïdes secondaires (Sozzani, 2005; Yao et al., 2002).

3.7 Chargement des peptides sur les molécules du CMH

Les antigènes capturés par les DC immatures suivent des voies intracellulaires précises afin d'être dégradés puis présentés par les molécules du CMH.

3.7.1 Définition des molécules du CMH

Il existe deux types de molécules du CMH, les molécules de classe I et II. La molécule du CMH de classe I est une glycoprotéine transmembranaire constituée d'un hétérodimère formé d'une chaîne α à trois domaines extracellulaire (α 1, α 2, α 3) ancrée dans la membrane. Le domaine proximal α 3 s'apparie de façon covalente à la β 2 microglobuline. Les domaines distaux α 1 et α 2 sont impliqués directement dans la fixation du peptide. Le peptide présenté par cette molécule est de petite taille de l'ordre de 9 acides aminés. Cette molécule est ubiquitaire, exprimée par la majorité des cellules nucléées.

La molécule du CMH de classe II est formée de deux chaînes, une chaîne α et une chaîne β qui sont ancrées dans la membrane. Chacune de ces deux chaînes est constituée de deux domaines extracellulaires. L'appariement des domaines distaux α 1 et β 1 forme le sillon de présentation. Le CMH de classe II porte un peptide plus long que celui présenté par le CMH de classe I, comprenant entre 12 et 25 acides aminés.

3.7.2 Le chargement des peptides sur les molécules du CMH

3.7.2.1 Molécules de CMH de classe I

La molécule de classe I peut présenter des antigènes par voie endogène (protéines endogènes membranaires ou sécrétées) ou par voie exogène (protéines exogènes internalisées dans la cellule présentatrice d'antigènes) (Figure 6).

✤ <u>Voie endogène</u>

Les protéines endogènes présentées par le CMH classe I sont générées dans le cytosol. Après ubiquitination, ces protéines sont dégradées en peptides par le protéasome (complexe protéasique multicatalytique). Elles comprennent tous les polypeptides produits de façon endogène, sécrétés ou membranaires et qui sont traités dans le cytosol comme produits défectifs ribosomaux DRiPs (defective ribosomal products). Les peptides obtenus sont transportés dans le réticulum endoplasmique (RE) par l'intermédiaire du transporteur TAP1/2 (Transporter associated with Antigen Processing) de manière ATP dépendante pour se lier aux molécules du CMH de classe I. L'assemblage de la chaîne lourde α avec la β 2microglobuline et le peptide permet la formation d'une molécule du CMH chargée et stable. Ce processus nécessite l'implication des protéines chaperonnes. En effet, la chaîne a synthétisée dans le cytosol s'associe à la protéine chaperonne, calnexine lors de son entrée dans le RE. Quand la β 2-microglobuline se lie à la chaîne α , l'hétérodimère se dissocie alors de la calnexine et se lie à la calréticuline. En parallèle, une association de la tapasine à TAP se fait, favorisant le chargement du peptide aux molécules de classe I du CMH. La molécule de CMH de classe I/peptide complètement repliée passe du RE vers la membrane plasmique, où elle présente les antigènes aux lymphocytes T CD8⁺.

Voie exogène ou voie de présentation croisée

La présentation des peptides exogènes par les molécules de CMH de classe I qui est dénommée présentation croisée (*cross presentation*) a été initialement décrite par M. Bevan en 1979. Deux voies ont été décrites pour expliquer l'acheminement intracellulaire des antigènes exogènes permettant leur présentation aux molécules de CMH de classe I.

La première voie est celle impliquant des transporteurs TAP1/2 qui permet de transporter des antigènes depuis les endosomes jusqu'au cytosol afin d'être dégradés par le protéasome et ensuite rejoindre la voie classique de présentation par la molécule du CMH de classe I. La seconde voie est indépendante de TAP ce qui suggère que les antigènes dégradés se lient aux molécules du CMH de classe I dans les endosomes. En effet, il a été montré que les endosomes ont toutes la machinerie permettant le chargement des molécules de CMH de classe I.



Figure 6 : Voie du CMH de classe I : Présentation des antigènes endogènes par voie directe ou des antigènes exogènes par voie croisée D'après (Wilson and Villadangos ; 2005)

3.7.2.2 Molécules de CMH de classe II

Les antigènes exogènes capturés par phagocytose, par macropinocytose ou par endocytose se lient à des molécules de CMH de classe II de la DC. Ces antigènes, quel que soit le mécanisme utilisé pour leur internalisation, progressent tout au long de l'axe endosomelysosome où ils sont exposés à un environnement acide. Ils sont apprêtés dans les endosomes qui fusionnent avec les lysosomes contenant les protéases nécessaires à la dégradation des protéines antigéniques en peptides. En parallèle, l'assemblage des chaînes $\alpha\beta$ de molécules de classe II du CMH se fait dans le RE. Suivant l'assemblage et durant leur passage dans l'appareil de golgi, elles sont protégées contre un chargement des antigènes endogènes par la molécule invariante li qui s'associe aux chaînes $\alpha\beta$. Un motif présent dans la partie intracytoplasmique de la molécule li permet le passage de ce complexe CMH II/li dans le compartiment endosomal. Les endosomes contiennent des protéases, telles que les cathepsines S qui s'activent dans un milieu à pH acide, permettant la conversion de la chaîne invariante li en molécule CLIP. Ensuite, la molécule CLIP se dissocie permettant la fixation du peptide exogène. Ce processus nécessite la présence des protéines chaperonnes H-2DM qui interagissent d'une manière transitoire avec le complexe CMH II/CLIP afin de le déstabiliser, permettant le relargage de CLIP et son remplacement par le peptide. En effet, il a été montré que les molécules de CMH de classe II restent associées à CLIP chez les souris déficientes en H-2DM. Le complexe formé CMH II/peptide est exporté dans des vésicules vers la membrane plasmique pour la présentation de l'antigène aux lymphocytes TCD4⁺ (Figure 7) (Wilson and Villadangos, 2005).



Figure 7 : Voie du CMH de classe II : Capture, apprêtement et présentation des antigènes exogènes D'après (Wilson and Villadangos ; 2005)

3.8 Molécules de CMH de classe I non classiques CD1

L'existence de molécules CD1 est connue depuis plus de deux décennies. Les gènes de CD1 codent pour une famille de glycoprotéines de surface hautement conservée entre les espèces. Bien que les protéines CD1 soient structurellement liées à la famille de CMH de classe I, elles ont divergé par leur caractère non polymorphe et leur capacité à présenter des antigènes lipidiques. Chez l'homme, le locus CD1 comprend cinq gènes (CD1a à CD1e) localisé sur le chromosome 1. L'expression des gènes de groupe 1 (CD1a, CD1b, CD1c et CD1e) est

inductible dans les cellules myéloïdes ; en revanche, les gènes de groupe 2 (CD1d) sont constitutivement exprimés. D'autres espèces de mammifères expriment également les gènes codants CD1, probablement en raison d'une pression sélective fonctionnelle, ceci à l'exception des rongeurs qui expriment seulement deux gènes (CD1d1 et CD1d2) homologues du CD1d humain et codant chacun une molécule (Dascher and Brenner, 2003; Mori et al., 2016). CD1a, CD1b et CD1c sont impliquées dans la présentation d'antigènes lipidiques exogènes tandis que CD1d est aussi impliquée dans la reconnaissance des glycolipides endogènes. CD1e, d'homologie intermédiaire entre les groupes 1 et 2, est une protéine intracellulaire qui ne transite pas à travers le membrane plasmique, qui est présente sous forme soluble dans les endosomes ou les lysosomes tardifs et qui est impliquée dans la présentation des glycolipides (Tourne et al., 2008).

Dans cette partie, nous allons décrire en détail la molécule CD1d et les interactions des cellules iNKT avec les DC.

3.8.1 Expression et structure moléculaire de CD1d

Les protéines CD1d de type « CMH-I-like » sont des hétérodimères composés d'une chaîne lourde glycosylée d'environ 49 KDa associée d'une manière non covalente à une chaîne de β 2-microglobuline. La chaîne lourde est constituée de trois domaines extramembranaires (α 1, α^2 , α^3), d'un domaine transmembranaire et d'une courte queue intracellulaire (Figure 8). Des données de cristallographie ont montré la présence de cavités apolaires dans les domaines al et $\alpha 2$, qui sont similaires aux domaines de liaison à l'antigène des peptides du CMH de classe I et II (Figure 9). Par ailleurs, la cristallisation de CD1d murin a mis en évidence l'existence d'un sillon profond contenant deux grandes poches hydrophobes (nommé A' et F') permettant de fixer des antigènes lipidiques (Figure 8 et 9). Ce sillon hydrophobe qui est présenté par les domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ encadre 8 feuillets β antiparallèles. Seul le domaine $\alpha 3$ s'associe seulement à β2m (Moody et al., 2005; Zeng et al., 1997). Les antigènes lipidiques identifiés présentés par les molécules CD1 sont des antigènes amphiphiles contenant une tête hydrophile et une queue hydrophobe. Les chaînes alkyles de ces antigènes sont placées dans les profondes poches hydrophobes tandis que la partie hydrophile est présente à la surface de la molécule CD1 (Grant et al., 2002; Melián et al., 2000; Porcelli and Brenner, 1997; Zajonc et al., 2005). Le TCR se met en contact à la fois avec la tête hydrophile polaire de l'antigène et avec les acides aminés des deux chaînes α1 et α2 de CD1 à l'entrée de la cavité hydrophobe. En effet, dans le cas de la présentation de l' α -GalCer, les chaînes hypervariables CDR1 α et 2 α du TCR interagissent seulement avec le CD1d tandis que la boucle CDR3 α se met en contact avec l'antigène. (Koch et al., 2005; Moody et al., 1997; Zajonc et al., 2005). La structure de la molécule CD1d est donc apparentée aux CMH de classe I alors que l'apprêtement des antigènes présentés par cette molécule a des ressemblances avec celui des molécules de CMH de classe II.



Figure 8 : Structure de la molécule CD1d : Vue de côté (A) et de dessus (B) D'après (Zeng et al., 1997)



Figure 9 : Structure de la molécule CD1d avec les sites de liaison à l'antigène en comparaison avec la molécule de CMH de classe I D'après (Moody et al., 2005).
3.8.2 Localisation et assemblage des molécules CD1d

La molécule CD1d est exprimée par la plupart des cellules hématopoïétiques, en particulier par les DC, les macrophages et les lymphocytes B (Brossay et al., 1997; Roark et al., 1998). Les études chez la souris ont permis de découvrir l'itinéraire intracellulaire suivi par la molécule CD1d et les voies d'apprêtement des antigènes lipidiques par cette molécule. Grâce à des marquages intracellulaires de lignées murines, il a été montré une distribution cytoplasmique de CD1d, au niveau du RE, sur la membrane plasmique, et dans tout le compartiment endosomal (précoce et tardif). Il a aussi été observé une co-localisation de la molécule CD1d avec LAMP-1 (*lysosomal associated-membrane protein-1, CD107a*) qui est le marqueur des endosomes tardifs et des lysosomes (Jayawardena-Wolf et al., 2001). Chez l'homme, en revanche, la majorité de CD1d est localisée dans les endosomes (Kang and Cresswell, 2002; Rodionov et al., 1999).

La molécule CD1d est synthétisée dans le RE, repliée suite à des interactions avec les protéines chaperonnes calnexine, calréticuline et ERp57 permettant ainsi l'association à la β2m. A ce niveau-là, les molécules CD1d peuvent avoir deux voies distinctes, dites « extrinsèques » et « intrinsèques », aboutissant toutes les deux à leur accumulation dans les endosomes tardifs. La voie extrinsèque consiste pour la molécule CD1d synthétisée bloquée par la chaîne invariante li de se diriger directement vers les endosomes. La voie intrinsèque permet au CD1d chargé par un phospholipide endogène lui même chargé par MTP (*microsomal triglyceride transfer protein*) son transfert du RE à la surface cellulaire *via* la voie de sécrétion (Jayawardena-Wolf et al., 2001). CD1d est ensuite internalisé à partir de la membrane plasmique suite à la reconnaissance d'une base tyrosine sur la queue cytoplasmique du CD1d par la protéine adaptatrice AP-2 (Lawton et al., 2005). Une autre protéine adaptatrice, AP-3, est impliquée dans le passage du complexe CD1d entre les différents compartiments (les endosome tardifs et les lysosomes) (Cernadas et al., 2003).

Dans les cellules humaines, CD1d est internalisé dans les endosomes précoces de la membrane plasmique suite à l'interaction avec la protéine AP-2. En revanche, à l'exception de CD1b, toutes les molécules CD1 (CD1c, CD1a et CD1d) humaines ne peuvent pas suivre la voie intrinsèque jusqu'aux lysosomes du fait qu'elles ne fixent pas la protéine AP-3. Grâce

à l'association de CD1d avec la chaîne invariante, les molécules CD1d sont transportées jusqu'aux lysosomes directement à partir du RE (Kang and Cresswell, 2002; Sugita et al., 2002).

Comme nous l'avons évoqué précédemment, CD1d est une molécule fortement conservée au cours de l'évolution. Les CD1d humain et murin ne partagent que 65% d'homologie mais avec une conservation remarquable des acides aminés jouant un rôle important dans la structure et la fonction de la molécule, d'où la possibilité d'une reconnaissance inter-espèce du système CD1d-TCR. Les minimes différences existantes entre le CD1d humain et murin semblent être à l'origine des différences de fréquence des populations iNKT humaines et murines. Une étude en 2013 a montré, en utilisant des souris dépourvues de CD1d murin et knock-in (KI) pour le CD1d humain, que CD1d contrôle la fréquence des cellules iNKT. En effet, ces souris ont des fréquences des iNKT identiques à celle observées chez l'homme (Wen et al., 2013).

3.8.3 <u>Mécanisme de régulation de CD1d</u>

3.8.3.1 Généralité sur les Rho GTPase

Les Rho GTPase appartiennent à la superfamille des petites protéines G monomériques Ras. Cette superfamille compte plus de 150 membres qui sont fortement conservés chez tous les eucaryotes présentant 30 à 60% d'homologies entre elles. La famille Rho joue un rôle clé dans la régulation de l'organisation du cytosquelette, dans la progression cellulaire et dans la régulation de l'expression des gènes. Elle est composée de 20 membres dont RhoA, Rac et cdc42 qui sont les membres les plus connus et les mieux caractérisés.

3.8.3.2 Les Rho GTPase : « interrupteurs moléculaires »

Les protéines Rho sont formées de 190 à 250 résidus correspondant à une masse moléculaire d'environ 20-30 KDa. Au niveau structural, les Rho GTPase possèdent deux régions « *Switch I* et *switch II* » impliquées dans la liaison à l'effecteur ou au régulateur ; 4 régions de liaison au nucléotide (GTP et GDP) ; une région C-terminale hypervariable qui concentre la majeure partie des différences entre les membres de la famille des protéines Rho et une boîte « CAAX » sujette à des modifications post traductionnelles (Ridley, 2006) (**Figure 10**).



Figure 10 : Organisation structurelle des protéines Rho

Les Rho GTPase, comme toutes les autres petites protéines G, jouent un rôle d'interrupteur moléculaire. Elles cyclent entre un état inactif lié au GDP (Guanosine Diphosphate) et un état actif lié au GTP (Guanine triphosphate). En réponse à des signaux extracellulaire, le GDP est échangé avec le GTP, cette réaction étant régulée par un GEF (pour « *Guanine nucléotide Exchange Factor* »). La liaison avec GTP permet un changement de conformation de la protéine Rho au niveau de la région de liaison aux effecteurs qui peuvent alors interagir avec les Rho GTPase. La majorité des effecteurs possède un domaine d'interaction impliqué dans leur liaison avec les Rho GTPase. Ainsi, les effecteurs de Cdc42 et de Rac1 possèdent un domaine CRIB (pour « *Cdc42/Rac Interactive Binding* ») et ceux de RhoA un domaine RBD (pour « *Rho Binding Domain* »).

En revanche, le retour à l'état inactif nécessite l'intervention des protéines GAP (pour « *GTPase activating protein* ») permettant l'hydrolyse du GTP en GDP. Un troisième groupe de protéines, les GDI (pour « *Guanine Nucleotide Dissociation Inhibitors* »), interviennent dans ce cycle par la séquestration des protéines Rho dans le cytoplasme, ainsi isolé de ses effecteurs (Raftopoulou and Hall, 2004) (**Figure 11**).



Figure 11 : Cycle d'activation et d'inactivation des protéines Rho. D'après Raftopoulou and Hall, 2004

3.8.3.3 Les kinases dépendantes de Rho : ROCK

Une fois activées et adressées au compartiment membranaire cible, les Rho GTPase peuvent alors interagir avec leurs effecteurs et entraîner les cascades de signalisation. Les Rho sont surtout connues pour leur rôle dans la réorganisation du cytosquelette d'actine, en réponse à une grande variété de *stimuli* extracellulaires.

Ainsi, ROCK (pour «*Rho-associated, Coiled-coil Containig Protein Kinase* ») est l'un des effecteurs connus des protéines RhoA. Il existe sous deux isoformes ROCK1 et ROCK2 qui jouent un rôle essentiel dans l'assemblage et la contraction des fibres d'actine et la formation des points d'adhérences focaux. Les deux isoformes s'organisent de la même façon avec un domaine d'activité kinase en position N-terminale, suivi d'une région qui se structure en « coil-coiled » contenant le site de liaison des RhoA (domaine RDB) et un domaine PH en position C-terminale (Liao et al., 2007) (**Figure 12**).



Figure 12: Structure et homologies des deux isoformes ROCK. D'après Liao et al., 2007

Une cible activée par ROCK est la kinase LIMK (pour «*LIM domain kinase* »). Cette dernière joue un rôle dans les phénomènes qui contrôlent la dynamique des fibres d'actine en particulier leur stabilisation. Elle phosphoryle et inhibe la cofiline, une protéine se liant à l'actine et favorisant sa dépolymérisation. L'inhibition de la cofiline par ces kinases est sensible au traitement par y-27632, ce qui indique l'implication des ROCK dans leur régulation (Ridley, 2006) (**Figure 13**). Une autre cible de ROCK est la phosphatase MLC (pour «*Myosine Light Chain* ») qui est un régulateur négatif de la chaîne légère de la myosine. ROCK phosphoryle et inhibe la phosphatase de la MLC permettant ainsi l'association de la myosine aux filaments d'actine. Cette association permet de stimuler l'activité ATPasique et promeut ainsi la contraction des fibres d'acto-myosine.



Figure 13 : Voies de signalisation activées par Rho et contrôlant le cytosquelette d'actine. D'après Ridley, 2006

En conclusion, la voie de signalisation Rho/ROCK/LIMK permet la réorganisation du cytosquelette d'actine. De manière intéressante, il a été montré que cette voie régule négativement la présentation antigénique par la molécule de CD1d. La neutralisation de ROCK dans une lignée exprimant CD1d en utilisant des inhibiteurs pharmacologiques ou des constructions shRNA augmente la présentation antigénique par CD1d (Gallo et al., 2012).

4. <u>La leucémie myéloïde chronique, un exemple du</u> <u>défaut des effecteurs de l'immunité innée iNKT et DC</u>

4.1 Introduction

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est une hémopathie maligne caractérisée par l'accumulation de progéniteurs myéloïdes dans la moelle osseuse accompagnée d'une augmentation considérable du nombre de globules blancs dans le sang périphérique (hyperleucocytose). Cette pathologie est due à une prolifération monoclonale des cellules progénitrices myéloïdes provenant d'une mutation qui se produit dans les cellules souches hématopoïétiques. En l'absence de traitement, cette maladie évolue classiquement en trois phases successives : une phase chronique de 3 à 5 ans, une phase d'accélération et une phase de transformation aiguë (Deininger et al., 2000; Faderl et al., 1999; Wong and Witte, 2004). L'évènement majeur de cette affection, mis en évidence en 1960 par Nowel et Hungerford, réside dans le chromosome anormalement court dénommé chromosome Philadelphie (Ph). En 1973, il a été montré que ce chromosome correspond au chromosome 22 raccourci résultant d'une translocation équilibrée entre les bras longs des chromosomes 9 et 22, t (9; 22) (q34; q11). Cette translocation conduit à la fusion du gène bcr (Breakpoint Cluster Region) en 22q et du proto-oncogène abl (Abelson) en 9q générant ainsi un gène chimérique bcr-abl (Figure 14). La protéine produite par ce gène de fusion possède une activité tyrosine kinase (TK) non contrôlée responsable de la transformation leucémique. Elle augmente la capacité proliférative et la survie cellulaire avec une altération de l'adhérence et une inhibition des voies antiapoptotiques. Le lien direct entre l'oncogène bcr-abl et le développement d'une leucémie myéloïde chronique a été montré chez la souris par des expériences de transplantation avec des cellules infectées par un rétrovirus contenant le gène bcr-abl. En effet, les souris qui ont été greffées avec ces cellules développent un syndrome myéloprolifératif proche de la LMC chez l'homme. Il faut noter que ce modèle a des limites du fait que la phase chronique chez la souris évolue rapidement vers une transformation aiguë (Daley et al., 1990; Pear et al., 1998).



Figure 14 : La translocation t(9; 22)(q34; q11) et la génération du gène chimérique BCR-ABL. D'après (Chomel et al., Immunoanalyse et biologie spécialisée, 2009)

L'étiologie de la LMC reste inconnue même si dans 5% des cas l'exposition chronique au benzène ou aux radiations ionisantes est un facteur induisant la maladie. L'incidence de la LMC est de 1 à 2 cas pour 100 000 adultes avec une légère prédominance masculine et une incidence croissante avec l'âge, ce qui représente environ 15% des nouveaux cas diagnostiqués de leucémies chez les adultes. Depuis les années 2000 avec l'introduction de l'imatinib (IM), un inhibiteur de l'activité tyrosine kinase (ITK) dérégulée de BCR-ABL, la mortalité annuelle dans la LMC a diminué passant de 10-20% à 1-2%. Une conséquence de ceci, est l'augmentation de la prévalence aux Etats-Unis, estimée à 30 000 cas/an pendant les années 2000, 100 000 en 2015 et atteindra un plateau d'environ 180 000 cas en 2030 (Jabbour, 2016).

4.2 Biologie moléculaire du chromosome Philadelphie

La translocation réciproque t (9 ; 22) (q34 ; q11) est à l'origine d'une fusion de la région 5' du gène *bcr* avec la région 3' du gène de *c-abl* sans perte de matériel génétique.

4.2.1 Le gène abl et sa protéine

Le gène *c-abl* localisé sur le chromosome 9 code pour une protéine de 145 KD et comporte 11 exons (dénommés a1-a11). Le premier exon possède deux variants (1a et 1b) à l'origine de deux transcrits (1a et 1b) issus d'un épissage alternatif. Les points de cassure sur ce gène se situent avant l'exon 2 (a2) dans une région intronique présente entre les exons 1a et 1b (figure 15). La protéine ABL contenant l'exon 1A est majoritaire et est localisée au niveau nucléaire tandis que celle contenant l'exon 1B est localisée au niveau membranaire grâce à un groupe myristoyl. ABL est une protéine kinase formée de plusieurs domaines. On note trois domaines

d'homologie SH (Src Homology) : 1) SH1 qui est le support de l'activité tyrosine kinase ; 2) SH2 qui permet l'interaction avec les protéines ayant des résidus tyrosine phosphorylés et la régulation positive du domaine SH1, et 3) SH3 qui est considéré comme régulateur négatif du domaine SH2. La partie N-terminale de la protéine joue un rôle dans la transmission de signal. La partie C-terminale contient un domaine de fixation aux filaments d'actine et d'ADN ainsi qu'un domaine de localisation nucléaire : NLS (pour « *Nuclear localization signal* »).



Figure 15 : Structure de la protéine ABL codée par le gène *abl.* NLS : Nuclear Localisation Signal ; NES : Nuclear Export Signal ; SH3 : Src Homology 3 ; SH2 : Src Homology 2 ; FABD : Domaine de liaison à l'actine ; L : SH2/Kinase Linker

La conformation inactive ou active de la kinase ABL endogène fait intervenir deux résidus tyrosines : Y412 présent dans le segment d'activation du domaine tyrosine kinase et Y245 qui se trouve dans le linker SH2/domaine kinase. La conformation inactive ou l'auto-inhibition de la kinase est associée au groupement myristate situé en N-terminal. L'ancrage de ce groupement au niveau d'une poche hydrophobe du lobe C du domaine kinase permet la formation d'un verrou et le rapprochement des domaines SH2 et SH3 bloquant ainsi l'accès à Y412 du segment d'activation dans le domaine catalytique. Le déverrouillage du groupe myristoyl du lobe C permet de libérer Y412 induisant la phosphorylation de celle-ci. L'activation totale de la kinase ABL se fait par phosphorylation de Y245 (Figure 16) (Sirvent et al., 2008).



Figure 16 : Modèle de régulation de l'activité tyrosine kinase de c-ABL. D'après (Sirvent et al., 2008)

4.2.2 Le gène bcr et sa protéine

Le gène *bcr* comporte 23 exons (dénommés e1-e23) et code pour une protéine cytoplasmique de 160 KD. On distingue plusieurs points de cassure sur ce gène. Deux sont localisés dans la région M-*bcr* (pour « Major breakpoint cluster region ») entre les exons 12 et 16 (e12-e16) et un troisième dans la région m-*bcr* (pour « minor breakpoint cluster region ») avant l'exon 1 de *bcr* (e1).

La protéine BCR possède plusieurs domaines. On distingue la partie N-terminale avec le domaine d'oligomérisation qui permet à la protéine de se mettre en homodimère. En aval, un domaine comprend deux sites de liaison aux domaines SH2. Au centre de BCR se trouve un domaine d'homologie avec les protéines Dbl (*Diffuse B-cell lymphoma*) : facteur d'échange GTP /GDP (domaine GEF) capable d'activer Cdc42, Rac1 et RhoA. A l'extrémité, la partie C-terminale contient un domaine GAP qui permet l'hydrolyse de Rac (Figure 17) (Pour revue générale Turhan, 2002).



Figure 17 : Structure de la protéine BCR. BCC (Oli) : Domaine d'oligomérisation ; Liaison SH2 : Site de liaison du domaine SH2 d'ABL ; DH : Domaine d'homologie à Dbl ; PH: Domaine d'homologie à la pleckstrine ; C2 : Domaine C2, GAP : GTPase Activating Protein

4.2.3 Réarrangement bcr-abl

On distingue différentes formes de BCR-ABL (p190 et p210) selon le point de cassure dans le gène *bcr*. Le point de cassure qui se produit dans la région m-*bcr* donne l'ARNm de fusion e1a2 qui est traduit en une protéine de 190 kD dénommée p190^{*bcr-abl*}. Cette protéine est retrouvée dans 15-30% des leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL). Les deux autres cassures se produisent dans la région M-*bcr* et donnent lieu à deux ARNm de fusion e13a1 et e14a2 (respectivement b2a2 et b3a2). Ces deux ARNm sont traduits en une protéine chimérique de 210 KD dénommée p210^{*bcr-abl*}, laquelle est retrouvée chez 95% des patients atteints de LMC (**Figure 18**) (Delannoy, 2006; Melo, 1996).



Figure 18 : Représentation schématique des translocations BCR-ABL. D'après (Delannoy, 2006)

La protéine BCR-ABL se trouve sous forme de tétramère, une association de deux dimères permettant la trans/autophosphorylation et l'activation constitutive du domaine tyrosine kinase. Cette organisation est donc nécessaire au pouvoir oncogénique de BCR-ABL et est apportée par le domaine d'oligomérisation présent dans BCR lors de la fusion. En effet, il a été montré que la délétion de ce domaine diminue l'activité de BCR-ABL et renforce la sensibilité aux ITKs.

La perte de groupement myristate d'ABL empêche la conformation inactive de la protéine kinase et supprime son auto-inhibition. Cette perte permet à la région du domaine Ser/Thr kinase de BCR d'interagir avec le domaine SH2 d'ABL empêchant ce dernier d'interagir avec le lobe C, permettant ainsi l'accès permanent à Y412. La dimérisation de BCR-ABL induit la phosphorylation de ce résidu tyrosine conduisant ainsi à la phosphorylation de Y245 qui est indispensable à l'activation complète du domaine catalytique d'ABL (Hantschel and Superti-Furga, 2004; Smith et al., 2003).

La protéine BCR-ABL contient dans sa partie centrale un domaine dénommé DH qui est homologue à la protéine Dbl d'échange GTP/GDP, et qui se trouve en tandem avec un domaine d'homologie avec le pleckstrine (PH). Il faut noter que ce domaine DH/PH activateur des protéines G est présent dans la protéine BCR-ABL p210 et pas dans BCR-ABL p190. Ce domaine présente une activité GEF spécifique de RhoA. En effet, une mutation ponctuelle au niveau du domaine à activité catalytique RhoGEF (p210^{bcr-abl} S509A) altère seulement l'activation de RhoA et pas celles de Rac et de cdc42 (Harnois et al., 2003; Sahay et al., 2008; Daubon et al., 2008). Par ailleurs, le domaine GEF semble jouer un rôle essentiel dans le pouvoir transformant de BCR-ABL En effet, son inactivation diminue la prolifération cellulaire mais ne modifie pas l'indépendance aux facteurs de croissance des lignées hématopoïétiques 32D (Sahay et al., 2008) (**Figure 19**).

Le pouvoir oncogénique de BCR-ABL dépend de l'activité tyrosine kinase d'ABL. Son activation constitutive permet son autophosphorylation et la phosphorylation de différents substrats cellulaires (Pour revue, Ren, 2005).



Figure 19 : Structure de la protéine BCR-ABL (p210).

4.3 Voies de signalisation contribuant à l'activité oncogénique de BCR-ABL et conduisant à la leucémogenèse

La localisation cytoplasmique de la protéine BCR-ABL et son autophosphorylation lui permettent d'interagir avec différentes protéines adaptatrices, d'où son interférence avec les processus cellulaires normaux comme la prolifération, l'apoptose, l'adhérence et la stabilité génétique.

Voie Ras : Le résidu tyrosine 177 (Y177) de BCR dans BCR-ABL joue un rôle majeur dans le phénomène de leucémogenèse. L'activation de la voie Ras par BCR-ABL se fait par le recrutement du complexe Grb2/Gab2/Sos suite à l'autophosphorylation d'Y177. Ras activé s'associe par la suite avec la protéine Raf-1. Le passage de Raf-1 à la membrane conduit à

l'activation de la voie de signalisation Raf/Merk/Erk stimulant ainsi la transcription des gènes (c-Myc, c-Fos) impliqués dans la prolifération. La voie Ras stimule aussi l'expression des molécules impliquées dans l'initiation de cycle cellulaire telles que la cycline D1. De plus, cette voie joue un rôle important dans la survie cellulaire en activant l'expression des protéines anti-apoptotiques (BCL2, BCLxl) (Hazlehurst et al., 2009).

Voie PI3K/AKT: L'activation de la voie PI3K est associée à la phosphorylation des adaptateurs de BCR-ABL, CrkL et Cbl. La PI3K permet l'activation de la Ser/Thr kinase AKT. Cette dernière participe à la survie cellulaire en inhibant les protéines pro-apoptotiques et est capable de phosphoryler le facteur de transcription Foxo3a qui, à son tour empêche la transcription des gènes critiques pour l'induction de l'apoptose comme Bim. L'activation de STAT5 par BCR-ABL induit une résistance à l'apoptose en activant la transcription des gènes codant pour la protéine anti-apoptotique BCLxl. (Horita et al., 2000; Steelman et al., 2004).

Une autre voie, dénommée « *voie Rac* », est impliquée dans les activités transformantes de BCR-ABL. En effet, il a été montré dans un modèle murin induit par P210 BCR-ABL que la déficience en Rac 1 et Rac 2 réduit significativement la prolifération cellulaire. De plus, BCR-ABL est capable de former un complexe avec Rac 1 et Rac 2 en modifiant les propriétés de migration et d'adhésion des cellules leucémiques (Thomas et al., 2008).

4.4 Traitements et définition des critères de réponse

Le traitement en phase chronique a pour but d'éliminer les cellules porteuses du chromosome Ph et d'induire une rémission hématologique rapide.

Tout d'abord, nous allons définir les critères de réponse hématologique, cytogénétique et moléculaire en se basant sur les caractéristiques cliniques et biologiques, et sur la proportion des cellules porteuses du chromosome Philadelphie.

4.4.1 Critères de réponse hématologique

✤ <u>La réponse hématologique complète</u>

Elle se définit par une normalisation de l'hémogramme (leucocytes < 10G/L, pas de myélémie, thrombocytémie < 450 G/L) et une disparition de tous les symptômes et les signes cliniques de la maladie

✤ <u>La réponse cytogénétique</u>

Cette réponse est évaluée selon la proportion des cellules porteuses de chromosome Ph au sein des cellules métaphasiques ou interphasiques du sang périphérique ou de la moelle, ceci en étudiant le caryotype ou en utilisant la technique d'hybridation fluorescente *in situ (FISH)*. Il existe trois niveaux de réponse cytogénétique exprimés en % de cellules porteuses du chromosome Ph (en considérant que 100% correspond à une absence de réponse cytogénétique) :

- 1. la réponse cytogénétique complète (RCC) : 0%
- 2. la réponse cytogénétique partielle (RCP) : entre 1 et 35%
- 3. la réponse cytogénétique mineure (RCm) : entre 35 et 95%
- 4. Pas de réponse cytogénétique : 100%

✤ <u>La réponse moléculaire</u>

Par RT-PCR, on peut évaluer le ratio de transcrit de BCR-ABL/ABL dans la moelle ou dans le sang. Le niveau de réponse moléculaire est déterminé en suivant la diminution du taux de transcrit par rapport à celui décelé au diagnostic de la maladie. On définit une réponse moléculaire majeure lorsque le taux de transcrit diminue d'un facteur 1000 par rapport à son niveau de base et une réponse moléculaire complète lorsque le taux de transcrit est indétectable (Ledoux & Natarajan-Ame, 2013).

4.4.2 Traitements

Historiquement, le busulfan est l'agent chimiothérapeutique cytotoxique qui était utilisé pour le traitement de la LMC. Il a été remplacé plus tard par un traitement moins nocif constitué par l'hydroxyurée (Hydréa) avec une faible probabilité d'obtenir une rémission cytogénétique durable. L'introduction de l'interféron- α en 1980 a permis de montrer une amélioration de la survie par comparaison aux agents chimiothérapeutiques avec obtention de rémissions cytogénétiques complètes et durables. Actuellement, L'IFN- α est encore utilisé dans plusieurs essais cliniques mais seulement en combinaison avec les ITKs. Il possède une action antivirale, immunomodulatrice et antiproliférative (Jabbour, 2016).

La transplantation allogénique des cellules souches hématopoïétiques est considérée comme le seul traitement qui peut offrir une chance de guérison des patients atteints de LMC. Elle permet l'élimination des cellules leucémiques et la reconstitution d'une hématopoïèse normale. Les cellules du donneur (compatible avec le patient) sont transfusées chez le patient recevant au préalable une chimiothérapie à des doses normales. Le but de cette greffe est de remplacer les cellules souches des patients et de mettre à profit les globules blancs du donneur qui reconnaissent les cellules leucémiques du receveur comme étrangères. Ce mécanisme est une réaction du greffon contre la tumeur. Les cellules du donneur réactives contre la leucémie persistent chez le receveur empêchant la survenue de rechutes. La possibilité d'éliminer le chromosome Ph a permis d'envisager des stratégies d'autogreffe de moelle osseuse, moins toxique que l'allogreffe et proposée à un nombre élevé de patients du fait qu'elle n'est pas limitée par l'existence d'un donneur compatible. Cependant, ce traitement supprime l'effet immunologique de réaction de greffon contre la tumeur. Cet effet peut être compensé par des traitements par interféron- α et/ou IM après greffe (Olavarria, 2007).

La découverte du rôle essentiel de l'activité tyrosine kinase dans le phénotype transformant de la protéine BCR-ABL a permis d'envisager le développement de molécules comme l'IM dont le principe actif est l'inhibition de cette activité. Il agit par inhibition compétitive de la fixation de l'ATP. En effet, l'IM se fixe au niveau du domaine tyrosine kinase de la protéine ABL quand elle est en conformation inactive non phosphorylée empêchant ainsi la fixation de l'ATP et son passage alors en conformation active (O'Dwyer et al., 2002). Les premières études *in vitro* et *in vivo* dans des modèles murins ont montré que l'IM inhibe sélectivement la prolifération des cellules leucémiques en induisant l'apoptose (Gambacorti-Passerini et al., 1997). On sait que le traitement avec l'IM ne permet pas d'éradiquer la totalité des cellules leucémiques et qu'il n'est efficace que chez 80% des patients, 20% développant des résistances. D'où la découverte de nouveaux ITKs dits de deuxième et troisième génération.

4.5 Résistance au traitement par l'IM

On distingue deux type de résistance : 1) la résistance primaire qui touche moins de 10% des patients et qui est définie par une absence de rémission hématologique après 3 mois et d'une réponse cytogénétique après 6 mois de traitement avec IM ; 2) la résistance secondaire qui est définie par une perte de la réponse initialement acquise par la thérapie. Il faut noter que les mécanismes conduisant à la résistance à l'IM peuvent être dépendants ou indépendants de BCR-ABL et de son activité tyrosine kinase (Baccarani et al., 2006; Hughes et al., 2006).

Mécanismes de résistance dépendants de BCR-ABL

<u>Mutation au niveau de tyrosine kinase de BCR-ABL</u>: la première mutation se situe dans la région codant pour le site de fixation de l'ATP du domaine kinase d'ABL. C'est une substitution de la thréonine en position 315 par une isoleucine (T315I). Elle représente 20% de toutes les mutations et est la seule mutation conférant aussi une résistance aux ITKs de deuxième et troisième génération (Gorre et al., 2001).

Une autre mutation décrite qui se produit aussi dans le domaine tyrosine kinase au niveau de la région P-loop, le site de fixation pour le phosphate de l'ATP, entraînant une diminution d'affinité pour l'IM (Hochhaus et al., 2002).

Mécanismes de résistance indépendants de BCR-ABL

<u>Transporteurs d'efflux :</u> une augmentation du transport d'IM dépendant du gène MDR1 qui détermine la synthèse de la pompe d'efflux de la PgP-glycoprotéine. Ce gène a été décrit dans une lignée résistante à l'IM. Différents équipes ont montré que l'inhibition de cette pompe dans ces lignées restaure la sensibilité à l'IM associée à une augmentation des concentrations intracellulaires en IM. La résistance liée à MDR1 est difficile à évaluer *in vivo* du fait que ce gène est fortement exprimé par les cellules du sang périphérique (Dulucq et al., 2008).

<u>Transporteurs d'influx :</u> Le transport de l'IM vers l'intérieur de la cellule se fait par le transporteur hOCT1 (pour « *human organic cation transporter 1* »). Il a été montré que la qualité de réponse à l'IM chez les patients est dépendante du niveau d'expression d'OCT1 (White et al., 2007).

<u>Activation des voies de signalisation indépendantes de BCR-ABL :</u> Des modèles cellulaires (K562) *in vitro* ont montré que la résistance à l'IM résulte de l'activation de la voie des Src kinases. En effet, le traitement par un inhibiteur de Src kinase inhibe la prolifération cellulaire. Chez les patients en phase accélérée de LMC, il a été montré une augmentation de l'activité de Src kinase en rapport probablement avec l'évolution de la maladie (Donato et al., 2003).

<u>Altération épigénétique :</u> Les modifications de l'expression génique et de la stabilité de génome, suite aux altérations touchant l'ADN et la chromatine, sont des mécanismes observés lors du développement de la LMC ou de la résistance à l'IM. Par exemple, la méthylation de l'ADN et l'acétylation des histones sont deux mécanismes affectant l'accessibilité des facteurs de transcription à l'ADN. Ils pourraient entraîner une prolifération cellulaire anormale et une résistance à l'apoptose. De plus, il a été montré une synergie entre les ITK et

les inhibiteurs d'histone déacétylases permettant une augmentation de l'apoptose des cellules primaires des patients atteints de LMC (Kircher et al., 2009).

4.6 Implication du système immunitaire dans le contrôle de la leucémie myéloïde chronique

Comme nous l'avons vu dans la partie I de cette introduction générale, le système immunitaire joue un rôle essentiel dans le contrôle de la LMC. Ceci est appuyé par un faisceau d'arguments qui sont résumés ci-dessous.

4.6.1 <u>Allogreffe des cellules souches hématopoïétiques</u>

L'obtention de réponses moléculaires complètes accompagnées de rémissions de longue durée chez les patients ayant subi une greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) est un des arguments en faveur du rôle du système immunitaire dans le contrôle de la leucémie. Ce traitement, dénommé GVL (pour « Graft Versus Leukemia »), a pour effet de permettre aux cellules immunes du greffon de détruire les cellules leucémiques. Il est contrebalancé par la survenue de complications étroitement liées à l'effet GVHD (pour « Graft Versus Host Disease ») qui augmente certes la mortalité mais diminue le risque de rechute (van Rhee et al., 1997; Stern et al., 2014). En effet, les patients développant une GVH après greffe de CSH rechutent moins fréquemment que les patients n'ayant pas développé de GVH. Par ailleurs, la déplétion en cellules T de greffon dans le but de diminuer les risques de mortalité liés à la GVH entraîne une augmentation importante du risque de rechute de la maladie au cours de plusieurs hémopathies malignes en particulier la LMC. Cette déplétion entraîne non seulement une diminution de l'effet GVH mais aussi de l'effet GVL (Devergie et al., 1990; Goldman et al., 1988; Horowitz et al., 1990). Ces observations ont montré l'importance du système immunitaire, en particulier des cellules T, dans l'élimination de la maladie. Enfin, la transfusion des lymphocytes T du donneur aux patients atteints de LMC qui ont rechuté après allogreffe permet le réinduction d'une réponse hématologique ou cytogénétique (Garber et al., 2014; Kolb et al., 1990). Ces résultats ont apporté la preuve définitive d'une implication des lymphocytes T dans le contrôle de la LMC.

4.6.2 Implication des lymphocytes T dans l'immunité anti-leucémique

Des réponses T cytotoxiques spécifiques d'antigènes tumoraux leucémiques ont été mises en évidence chez les patients atteints de LMC suggérant un rôle potentiel du système immunitaire dans le contrôle de la LMC. Les peptides dérivés issus de la région de jonction entre BCR et ABL peuvent agir comme néoantigènes qui sont présentés par HLA-A3 permettant d'induire une réponse T CD8 spécifique cytotoxique (Clark et al., 2001). D'autres travaux ont montré l'existence d'antigènes exprimés par la lignée myéloïde comme la protéinase 1 (PR1) dérivée de la protéinase 3 (PR3) ou d'antigènes ubiquitaires tels que WT-1 (pour « Wilms Tumor 1 protein ») et la télomérase/hTERT (Boissel et al., 2006; Guilhot et al., 2008). A titre d'exemple, des travaux *in vitro* ont montré que les cellules T CD8⁺ spécifiques du peptide antigénique dérivé de PR-3 présenté par la molécule de CMH HLA-A*0201 sont capables de lyser des cellules leucémiques HLA-A*0201 mais pas des cellules de moelle osseuse normale. Une corrélation entre le niveau d'expression cytoplasmique de PR3 et le degré de lyse des cellules T CD8 a été observée. De plus, ces cellules T CD8 cytotoxiques (CTL) spécifique de PR3 inhibent in vitro la formation de colonies leucémiques CFU-GM (pour « Colony forming units-granulocyte/macrophage ») (Molldrem et al., 1996, 1997). Par la suite, du fait que le peptide PR1 constitué une cible potentielle pour une réponse T spécifique contre la leucémie et grâce au tétramère PR-1/HLA-A0201, une forte corrélation a été mise en évidence entre le taux des cellules CTL spécifiques de PR1 et le degré de réponse au traitement par IFN- α ou allogreffe des CSH (Molldrem et al., 2000).

Une étude en 2003 a consisté à comparer l'ARN messager de l'IFN- γ dans les cellules T CD8 des sujets sains à celui des patients atteints de LMC (avant et après allogreffe des CSH) après une stimulation par WT1, PR1 et BCR-ABL. Cette étude a montré la détection à très faible fréquence de l'ARNm de l'IFN- γ en réponse à WT-1 et PR-1 et pas à BCR-ABL chez la moitié des donneurs sains. Par contre, une réponse T CD8⁺ spécifique des trois antigènes plus augmentée par comparaison aux sujets sains a été observée chez les patients leucémiques avant ou après allogreffe. On note une réponse plus élevée des lymphocytes T CD8⁺ vis-à-vis des antigènes PR-1, WT-1 et BCR-ABL chez les patients après allogreffe par comparaison aux patients au diagnostic. Ces observations suggèrent la préexistence des cellules T CD8⁺ spécifiques de la leucémie qui ne sont pas détectables chez le donneur et qui peuvent également se développer chez le receveur contribuant ainsi à l'effet GVL (Rezvani et al., 2003).

Ces observations ont conduit à réaliser des essais cliniques de vaccination (Rezvani et al., 2008; Rojas et al., 2007), lesquels ont permis à certains patients d'atteindre une réponse cytogénétique complète avec un niveau indétectable de transcrit BCR-ABL dans le sang périphérique et la moelle osseuse (Bocchia et al., 2010).

Par ailleurs, comme nous l'avons évoqué dans la partie I de notre introduction générale, le système immunitaire contribue à la progression des cancers. Plusieurs mécanismes d'échappement des cellules tumorales leucémiques ont été décrits. Des études réalisées dans un modèle murin de LMC ont montré que l'infusion thérapeutique des effecteurs CTL augmente la prolifération et la différenciation des cellules souches leucémiques exprimant les molécules de CMH classe I et les molécules de co-stimulation. Ce phénomène était induit par l'IFN-y des CTL (Schürch et al., 2013). De plus, en utilisant le même modèle d'induction de la LMC, il a été montré que les cellules CTL expriment fortement PD-1, une molécule inhibitrice des fonctions cytotoxiques de ces cellules. Ces résultats ont été confirmés chez des patients atteints de LMC avec en moyenne 64% des cellules T CD8⁺ exprimant PD-1 contre 9% chez les sujets sains. L'interaction de PD-1 avec son ligand PD-L1 exprimé à la surface des cellules leucémiques inhibe la production des cytokines (IFN- γ et TNF- α) et l'expansion des CTL. Afin d'étudier le rôle physiologique de cette molécule dans la LMC, la maladie a été induite chez des souris WT et déficientes pour PD-1. Les résultats ont montré que les souris déficientes survivent plus longtemps (Mumprecht et al., 2009). Une étude en 2015 utilisant un modèle de transfert adoptif de cellules CTL déficientes en IFN-y a conclu en un rôle de l'IFN- γ produit par les CTL dans l'augmentation de l'expression de PD-L1 sur les CSL. Le blocage de PD-1 durant le transfert adoptif des CTL chez des souris leucémiques réduit significativement le nombre des CSL permettant ainsi de diminuer le nombre de colonies, et augmente la survie des souris (Riether et al., 2015).

4.6.3 Implication des cellules NK dans l'immunité anti-leucémique

Les cellules NK joue un rôle essentiel dans l'élimination des cellules tumorales en utilisant leur propriété cytotoxique et *via* la production des cytokines. Différents arguments montrent l'implication de ces cellules dans le contrôle de la LMC. Des études ont mis en évidence une diminution du nombre des cellules NK avec une perte de leur propriété cytotoxique et de leur capacité proliférative au cours de la progression de la maladie de la phase chronique à la phase blastique (Chiorean et al., 2003). Les molécules MICA, MICB, et ULBP jouent un rôle majeur dans la détection des cellules tumorales par les cellules NK. Ces molécules sont

fréquemment exprimées dans les lignées et les cellules primaires tumorales. Elles agissent en se fixant sur leur ligand NKG2D, le récepteur activateur présent à la surface des cellules T CD8 $\alpha\beta^+$ et T $\gamma\delta^+$. Chez des souris transgéniques exprimant BCR-ABL, l'expression de ligand de NKG2D par les DC était augmentée puis diminuée après traitement par IM (Terme et al., 2005). Dans une étude portant sur des patients atteints de LMC en phase chronique, il a été montré que l'expression de MICA à la surface des cellules CD34 dépend de BCR-ABL (Cebo et al., 2006). Enfin, les cellules leucémiques semblent pouvoir échapper au contrôle du système immunitaire en exprimant des molécules MICA solubles capables de moduler l'expression de NKG2D à la surface des cellules T CD8 et des cellules NK (Boissel et al., 2006).

Les cellules NK peuvent contribuer à l'effet GVL au cours de l'allogreffe des CSH chez les patients atteints de LMC. En effet, une diminution des taux de rechute en cas de mésappariement entre donneur et receveur résulterait d'une perte de reconnaissance du HLA des cellules leucémiques par les récepteurs inhibiteurs des cellules NK du donneur, laquelle expliquerait l'engagement des récepteurs activateurs et la lyse des cellules tumorales, participant ainsi à l'effet GVL (Kärre, 2002; Ruggeri et al., 2002).

4.6.4 Implication des DC dans l'immunité anti-leucémique

Des études ont montré que les DC générées à partir des PBMC (pour « *Peripheral Blood mononuclear cells* ») des patients en phase chronique de la LMC sont morphologiquement normales avec une expression forte des marqueurs de maturation (CMH classe II, CD86, CD80, CD830). De plus, la majorité de ces cellules ne perdent pas BCR-ABL après différenciation. Ces cellules sont capables d'induire une réponse immunitaire cytotoxique contre des peptides synthétiques spécifiques de BCR-ABL *in vitro* (Eibl et al., 1997; Heinzinger et al., 1999).

Plus récemment, il a été montré une diminution significative des DC circulantes (myéloïdes et plasmacytoïdes) chez les patients atteints d'une leucémie myéloïde aiguë. Les pDC présentent une altération de capacité de maturation et de sécrétion d'IFN- α (Mohty et al., 2001). En 2002, il a été mis en évidence une réduction significative, voir une déplétion sévère du pourcentage des DC myéloïdes (CD11c⁺FLT3⁺Lin⁻) et des pDC (CD11c⁻FLT3⁺Lin⁻). Ces diminutions de fréquence des DC myéloïdes et des pDC pourraient être responsables respectivement du défaut de production d'IFN- α et d'IL-12 au cours de la LMC. Or l'IFN- α a un rôle immunomodulateur au cours de la LMC tandis que l'IL-12 joue un rôle majeur dans

la stimulation des cellules T spécifiques des antigènes leucémiques et des cellules NK (Mohty et al., 2002).

Dans un travail des années 2000, une analyse phénotypique des DC générées à partir des cultures des fractions des cellules adhérentes issues des PBMC des patients atteints de LMC a montré une diminution significative de l'expression de CD83, CD80, CD86, des molécules de CMH classe I (HLA-ABC) et des molécules de CMH classe II (HLA-DP/DR/DQ) après stimulation avec LPS, contrairement à ce qui avait été montré dans les années 1990. De plus, ces cellules avaient une capacité diminuée d'endocytose par comparaison aux DC des sujets sains (Eisendle et al., 2003). En accord avec ces résultats, une autre étude a montré une altération du cytosquelette d'actine et une diminution de la capacité de migration et d'apprêtement de l'antigène dans les DC BCR-ABL⁺ (Dong et al., 2003a). L'altération fonctionnelle des DC des patients atteints de LMC en phase chronique est probablement dépendante de la localisation et la signalisation altérée d'ABL, laquelle est co-localisée avec BCR-ABL et distribué au centre du cytoplasme et pas au niveau périphérique (Région d'actine polymérisée). Cette dérégulation spatiale de la distribution de la protéine ABL lui permet de partager avec BCR-ABL les mêmes voies de signalisation et les mêmes protéines adaptatrices. Une de protéines partagées est CRKL qui est étroitement liée à l'activation de cytosquelette d'actine. Une phosphorylation plus importante de CRKL est observée dans les DC des patients entraînant des anomalies de l'organisation du cytosquelette d'actine (Brown et al., 2014).

4.6.5 <u>Modulations de la réponse immunitaire par les différents traitements</u> <u>de la LMC</u>

4.6.5.1 Effets immunomodulateurs de l'IFN-α

L'IFN- α a constitué le premier traitement montrant une efficacité clinique lorsque l'allogreffe des cellules souches n'est pas envisageable. En effet, ce traitement permet d'obtenir chez certains patients des rémissions cytogénétiques complètes durables même après arrêt du traitement suggérant qu'il pourrait cibler la maladie résiduelle (Bonifazi et al., 2001; Veneri et al., 2012). Par ailleurs, l'IFN- α est un des acteurs de l'immunosurveillance. Des études ont montré qu'il existe une corrélation entre la réponse clinique à l'IFN- α et l'apparition de populations de lymphocytes T et B effectrices spécifiques de la LMC. De plus, le taux de rémission est fortement lié à une augmentation de l'activité des cellules NK (Meseri et al., 1991; Molldrem et al., 2000; Wu et al., 2000). Il a été montré que l'addition de l'IFN- α dans les cultures de DC dérivées des patients atteints de LMC augmente significativement l'expression des molécules de CMH de classe I et II et de co-stimulation permettant ainsi d'accroitre leur capacité de stimuler les lymphocytes T (Gabriele et al., 2004; Wang et al., 1999). Par ailleurs, l'IFN- α augmente la transcription de PR3 dans les monocytes permettant ainsi la présentation de cet antigène du soi. De plus, les cytokines sécrétées par les DC après traitement par l'IFN- α (TNF- α , IL-12, IL-15) favorisent la polarisation Th1 des CTL. Une des cibles essentielles de l'IFN- α sont les protéines ICSBP et IRF8 qui sont impliquées dans la LMC. En effet, les souris IRF-8 KO développent un syndrome myéloprolifératif similaire à la LMC chez l'homme. De plus, il a été montré que l'expression d'IRF8 est altérée dans la LMC et que la réponse à l'IFN- α est corrélée avec une augmentation de l'expression d'IRF-8 (Burchert and Neubauer, 2005).

4.6.5.2 Effets immunomodulateurs de l'IM

Plusieurs données mettent en avant des effets délétères de l'IM sur la réponse anti-tumorale. Le traitement de l'IM, en inhibant l'activité TK de BCR-ABL entraîne une diminution de l'immunogénicité de la cellule leucémique. Une perte de l'expression de l'antigène leucémique PR3 est observée après traitement avec IM diminuant ainsi la réponse dirigée contre celui-ci (Burchert et al., 2003). De plus, la diminution de l'expression de MICA par les cellules K562 induite après traitement in vitro avec IM est responsable de la diminution de l'activité lytique des cellules NK médiée par NKG2D (Boissel et al., 2006). L'IM semble inhiber la différenciation et la maturation (diminution de l'expression de CD1a, des molécules de co-stimulation et de CMH de classe I et II) de DC dérivées des cellules CD34 ou encore de monocytes des sujets sains. De ce fait, les auteurs ont attribué à l'IM un rôle dans la perte de la capacité des DC des patients atteints de LMC à induire une réponse T (Appel et al., 2004, 2005). Cependant, ces résultats diffèrent de ceux d'une autre étude portant sur des DC dérivées non plus de cellules CD34 mais de monocytes de patients atteints de LMC et qui décrit en présence d'IM une maturation normale associée à une augmentation du niveau d'expression des molécules de co-stimulation et du CMH. Enfin, une étude de 2013 rapporte que le traitement avec l'IM réduit l'expression des molécules du CMH de classe I avec une inhibition de l'activité du protéasome (Held et al., 2013).

A côté de ces effets d'inhibition de la réponse immunitaire, plusieurs équipes ont suggéré un effet immunostimulateur de l'IM sur les cellules du système immunitaire. Le traitement *in*

vitro avec l'IM des cellules pDC générées à partir des cellules CD34 de patients atteints de LMC en phase chronique entraîne la restauration quantitative et fonctionnelle de ces cellules (Mohty et al., 2004). Par ailleurs, il a été montré que le traitement avec l'IM des patients atteints de LMC entraîne une augmentation du nombre des lymphocytes B1 avec une réactivité contre les antigènes leucémiques. Ces cellules ne sont pas retrouvées chez les patients résistants à l'IM suggérant que l'IM est responsable de ces effets stimulateurs de la réponse immunitaire (Catellani et al., 2011).

4.6.5.3 Le Dasatinib et les grands lymphocytes granuleux (GLG) : reprogrammation des cellules T ?

L'intolérance ou la résistance à l'IM observée chez certains patients a conduit au développement d'ITK de seconde génération tels que le Dasatinib qui est désormais aussi utilisé en première ligne de traitement. De manière intéressante, 10 à 15% des patients traités par le Dasatinib ayant obtenu une rémission moléculaire développent une hyperlymphocytose comprenant des lymphocytes ayant un aspect de grands lymphocytes granuleux. Il s'agit de lymphocytes T $\alpha\beta^+$ ou T $\gamma\delta^+$ cytotoxiques de répertoire TCR restreint exprimant des marqueurs d'activation et NK. Cette hyperlymphocytose est associée à un meilleur contrôle de la LMC avec des rémissions cytogénétiques et moléculaires majeures complètes (Kreutzman et al., 2011).

Par ailleurs, une augmentation de l'expression de Granzyme B par les cellules T $CD8^+$ et t $CD4^+$ a été observée chez les patients traités par le Dasatinib. De plus, ces cellules ont un phénotype mémoire de type EMRA montrant l'augmentation des cellules mémoires cytotoxiques chez ces patients (Kreutzman et al., 2014).

Objectifs principaux

De nombreux arguments suggèrent l'implication du système immunitaire dans le contrôle de la LMC. Dans ce travail, nous avons étudié les lymphocytes iNKT au cours de cette maladie avec comme **premier objectif** de décrire leurs déficits éventuels chez les patients LMC au diagnostic et aussi de déterminer si la rémission complète de la maladie s'accompagne ou non d'une correction de leur potentiel fonctionnel anti-tumoral. Notre **second objectif** a été de déterminer si les DC myéloïdes des patients atteints de LMC, lesquelles expriment l'oncogène BCR-ABL, ont (ou non) leurs fonctions de coopération avec les cellules iNKT modifiées ; et dans l'affirmative, d'identifier les éléments moléculaires impliqués et leur lien avec l'oncogène BCR-ABL. Notre **dernier objectif** a été d'étudier une autre population T innée au potentiel anti-tumoral au cours de la LMC, laquelle a été identifiée dans le laboratoire et qui est similaire à celle récemment décrite chez la souris dont le développement dépend des cellules iNKT.

Résultats

Manuscrits 1 et 2

I- Altération fonctionnelle des cellules iNKT des patients en phase chronique de LMC : l'hypothèse d'un défaut d'expression membranaire de CD1d par les DC myéloïdes

De nombreuses études ont mis en évidence l'importance du système immunitaire au cours de la LMC et le rôle potentiel des cellules iNKT dans la réponse anti-tumorale. Cependant, aucune étude n'avait évalué le statut fonctionnel des lymphocytes iNKT chez les patients atteints de LMC.

La première partie de notre travail (Manuscrit 1) a permis de montrer de profondes altérations fonctionnelles des cellules iNKT au cours de la phase chronique de la LMC comprenant un défaut d'expression de PLZF et une diminution de production d'IL-4. Nous avons aussi mis en évidence une diminution significative de l'expression de l'arsenal cytotoxique (perforine et FasL) avec une capacité d'expansion *in vitro* fortement altérée, révélant l'état d'anergie de ces cellules. De manière intéressante, ces altérations phénotypiques et fonctionnelles sont corrigées chez les patients ayant obtenu une réponse cytogénétique ou moléculaire complète après traitement avec IM ou IFN- α , conduisant à proposer l'existence d'un contrôle de la LMC par cette population T innée.

Les cellules iNKT des patients n'ont pas d'activité tyrosine kinase BCR-ABL dérégulée. Cela nous a amenés à postuler l'existence d'un dysfonctionnement extrinsèque aux cellules iNKT dépendant de l'activité tyrosine kinase de BCR-ABL dans les CPA. Dans la deuxième partie de notre travail (**Manuscrit 2**), nous avons montré une diminution de l'expression de CD1d par les DC myéloïdes des patients LMC. Ce défaut n'est associé ni à un problème de synthèse de cette molécule ni à un défaut de maturation des DC myéloïdes comme l'atteste leur expression normale des molécules HLA-DR et CD86. De plus, nous avons montré que la diminution d'expression de CD1d est liée à un phénomène de rétention intracytoplasmique montré par cytométrie en flux et par microscopie confocale. Ainsi, nous avons mis en évidence que ce défaut est dû à l'expression de BCR-ABL dans les DC myéloïdes des patients

LMC-PC. En effet, nous avons montré une restauration complète d'expression de CD1d par les DC myéloïdes des patients en rémission cytogénétiques complète après traitement avec IM. Par ailleurs, le traitement des DC myéloïdes des patients LMC générées *in vitro* avec un inhibiteur de la voie Rho/ROCK restaure partiellement l'expression de CD1d membranaire et la présentation antigénique médiée par CD1d, alors que l'IM n'a aucun effet. L'ensemble de ces résultats permet de proposer que la voie Rho/ROCK, activée par le domaine GEF de BCR-ABL, est responsable de l'immunosubversion des lymphocytes iNKT, ceci en régulant négativement l'expression de CD1d sur les DC. L'amélioration de la présentation antigénique *via* la molécule CD1d après traitement *in vitro* avec les inhibiteurs de la voie Rho/ROCK est un argument fort en faveur d'une manipulation thérapeutique de cette voie comme élément adjuvant du traitement par les ITK favorisant ainsi une restauration optimale de la réponse anti-leucémique.

Manuscrit 1

870 Alexis Rossignol et al.

DOI: 10.1002/eji.201142043

Eur. J. Immunol. 2012. 42: 1870-1875

Immunology

SHORT COMMUNICATION

Evidence for BCR-ABL-dependent dysfunctions of iNKT cells from chronic myeloid leukemia patients

Alexis Rossignol^{*1,2}, Anaïs Levescot^{*1,3}, Florence Jacomet^{1,2,4,5}, Aurélie Robin⁶, Sara Basbous^{1,2}, Christine Giraud^{1,2,5,7}, Lydia Roy^{2,5,8,9}, François Guilhot^{1,2,5,8,9}, Ali G. Turhan^{1,2,5,10}, Anne Barra^{**1,2,4,5}, André Herbelin^{**1,3} and Jean-Marc Gombert^{**1,2,4,5}

¹ INSERM UMR S935, Poitiers and Villejuif, France

² Université de Poitiers, Poitiers, France

³ Université Paris-Sud XI, Orsay, France

⁴ Service d'Immunologie et Inflammation, Poitiers, France

⁵ CHU de Poitiers, Poitiers, France

6 INSERM UMR S1082, Poitiers, France

⁷ Etablissement Français du Sang Centre-Atlantique Site de Poitiers, Poitiers, France

- ⁸ Service d'Oncologie Hématologique et Thérapie Cellulaire, Poitiers, France
- 9 Centre d'investigation clinique INSERM-P-802, Poitiers, France

¹⁰ Service d'Hématologie et d'Oncologie Biologique, Poitiers, France

Chronic myeloid leukemia (CML) is a clonal hematopoietic stem-cell malignancy characterized by the presence of the chimeric BCR-ABL oncoprotein with deregulated tyrosinekinase (TK) activity. Although conventional T cells are acknowledged as important players in the control of CML, a possible modification of invariant NKT (iNKT) cells, known for their antitumoral activity, has not been established as yet. Here, we showed that the expression of perforin, CD95L, and promyelocytic leukemia zinc finger, a transcription factor required for maintenance of iNKT cell functions, was reduced or suppressed in CML patients at diagnosis, as compared with healthy individuals. The proliferation rate of blood iNKT cells in response to their cognate ligand was likewise diminished. These functional deficiencies were corrected in patients having achieved complete cytogenetic remission following TK inhibitor or IFN-a therapy. iNKT cells from CML patients in the chronic phase did not display increased TK activity, which argued against a direct autonomous action of BCR-ABL. Instead, we found that their anergic status originated from both intrinsic and APC-dependent dysfunctions. Our data demonstrate that chronic phase CML is associated with functional deficiencies of iNKT cells that are restored upon remission. These results suggest a possible contribution to disease control by TK inhibitor therapies.

Keywords: Anergy · Chronic myeloid leukemia · iNKT cells · Tyrosine-kinase inhibitors



Supporting Information available online

Correspondence: Dr. Jean-Marc Gombert e-mail: j.m.gombert@chu-poitiers.fr

*These authors contributed equally to this work. **These senior authors contributed equally to this work.

© 2012 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Introduction

Chronic myeloid leukemia (CML) is a well-characterized myeloproliferative disorder, initiated by the presence of the Philadelphia chromosome (Ph) generating the BCR-ABL oncoprotein, which gives rise to deregulated tyrosine-kinase (TK) activity in all leukemic cells [1]. For many years, allogeneic stem cell transplantation has been regarded as the standard curative therapy and was offered front line in patients in whom an HLA-compatible donor was available, with IFN- α therapy as a possible alternative [1]. However, based on the results of the International Randomized Study of Interferon and STI571 (IRIS) trial, imatinib mesylate (IM), a competitive inhibitor of the BCR-ABL TK activity, is currently used as a first line therapy of CML [2, 3].

A critical role of the immune system in the control of CML [4-8] is supported by several reports, even though the mechanisms of this antileukemic response are poorly understood. Invariant NKT (iNKT) cells constitute a distinct lymphocyte population sharing a conserved semi-restricted TCR that recognizes glycolipidic antigens in the context of CD1d [9], with the unusual ability to rapidly secrete both Th1 and Th2 cytokines upon primary stimulation, together with a complete cytotoxic arsenal. The transcription factor promyelocytic leukemia zinc finger (PLZF) directs the effector program of the iNKT cell lineage [10, 11] which is believed to play a key role in the regulation of various immune responses, including antitumor responses in experimental mouse models [12-15], as well as in human solid tumors [16-18] and hematopoietic malignancies [19, 20]. However, although the role of conventional T cells, particularly their tumor Ag-specific cytotoxic subset [4, 7, 8]. in the control of CML has been largely documented, the implication of iNKT cells has not been clearly established and has only been investigated in a single study comprising exclusively CML patients having undergone treatment with IM [21].

Here, we addressed this issue by comparing frequencies, perforin, CD95L, and PLZF expression, as well as proliferative responses between blood iNKT cells from healthy donors (HDs) and CML patients, either at diagnosis or after induction of complete remission (CR) by IM or IFN- α therapy. Based on our results, it can be concluded that iNKT cell functions are impaired during chronic phase (CP) CML, but return to normal after therapy.

Results and discussion

Functional deficiencies of iNKT cells in CML-CP patients are reversed by IM or IFN- α therapy

Significantly reduced blood iNKT cell frequencies have been reported in several forms of cancer, including hematologic malignancies [16–20]. Such a decrease in cell counts could not be evidenced in CML patients as assessed by flow cytometry analysis of PBMCs (Supporting Information Fig. 1), either in CP at the time of diagnosis or after molecular remission induced by IM (Supporting Information Fig. 2A). iNKT cells from CML-CP patients were both CD4⁺ and CD4⁻ at ratios similar to those found in HDs (Support-

© 2012 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

ing Information Fig. 2B and C). Only CML patients who achieved CR upon treatment with IFN- α had less iNKT cells than normal with a higher proportion of CD4⁺ T cells.

Knowing that iNKT cells are endowed with cytolytic activity enabling them to exert an antileukemic effect [19, 20], we examined whether their expression of perforin and CD95L was modified in CML patients relative to HDs (Fig. 1A and B, Supporting Information Fig. 3). This was clearly the case, since these molecules were either undetectable or expressed at very low levels during disease, while they were present in almost 40% iNKT cells in HDs, as measured by intracytoplasmic staining. However, in patients



Figure 1. Expression of perforin and CD95L, and proliferation in iNKT cells from CML patients and HDs. (A) PBMCs from CML-CP patients, IMor IFN-α-treated CML-CR patients, or HDs were cultured for 14 days in of introduced which patients, of this were membrane-labeled with arti-the presence of IL-2 and IL-15. Cells were membrane-labeled with arti-Va24-PE mAb and α -GalCer-loaded CD1d-TT-allophycocyanin, perme-abilized with Cytofix/CytopermTM kit, and stained with anti-perform FITC. Intracellular expression of perforin was analyzed after gating on the Va24⁺ α -GalCer-loaded CD1d TT⁺ cells. The frequency of perforin-expressing iNKT cells in CML-CP patients (10.9 \pm 0.7%, n = 3), HDs (39.4 \pm 10%, n = 5), IM-treated (39.4 \pm 8%, n = 8), and IFN- α -treated (35.2 \pm 5.2%, n = 5) CML-CR patients was determined. (B) PBMCs from CML-CP pah = 5) GML-CR patients was determined. (b) FBMCS from CML-CF pat-tients, IM- or IFN-α-treated CML-CR patients, or HDs were membrane-labeled with anti-CD3-PercPCy5.5 and anti-iNKT-FE 6B11 clonotype, permeabilized with Cytofix/Cytoperm[™] kit, and stained with anti-CD95L-allophycocyanin. Intracellular expression of CD95L was analyzed after gating on the CD3+6B11+ cells in CML-CP patients (12.5 \pm 4%, n = 8), HDs (40.7 \pm 6, n = 6), IM-treated (29.9 \pm 6, n = 6) and IFN- α -treated (44.1 \pm 8%, n = 3) CML-CR patients. (C, D) A total of 2×10⁵ PBMCs from CML-CP patients, IM- or IFN-α-treated CML-CR patients, or HDs were incubated with IL-2 and IL-15 in the presence or absence of α -GalCer. Fold expansion was calculated by dividing the number of $V\alpha 24^+$ $\alpha\text{-}GalCer\text{-}loaded$ CD1d TT+ cells recovered from a 14-day culture with $\alpha\text{-}GalCer$, by their number recovered from cultures without ligand. In some experiments, to define dividing cells, PBMCs were stained with carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE), prior to a 7-day culture with IL-2 + IL-15 in the presence or absence of α -GalCer. (C) Fold expansion of iNKT (V α 24+ α -GalCer-loaded CD1d TT+) cells in CML-CP patients (2.1 ± 0.9, n = 8), HDs (83.1 ± 16.9, n = 8), IM-treated (106.3 ± 38.9, n = 7) or IFN- α -treated patients (20.0 \pm 7.3, n = 5). (D) Proliferation was assessed via CFSE staining. Expression of CFSE was analyzed after gat-ing on the CD3+6B11⁺ cells. The frequency of dividing cells among iNKT cells in CML-CP patients (11.6 \pm 6%, n = 7), HDs (45.9 \pm 6%, n = 7), and The treated CML-CR patients (11.9 ± 0.9) , (n = 7), (11.9 ± 0.9) , (n = 7), and IM-treated CML-CR patients $(33.5 \pm 6\%, n = 3)$. Data are shown as mean \pm SEM from three to four separate experiments. Each symbol represents data from one donor/patient *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001; Mann–Whitney nonparametric test. ND: not done.

having achieved CR following IM or IFN- α therapy we observed a remarkable reversal of this deficiency, back to proportions occurring in HDs.

Because iNKT cell proliferation is reportedly arrested in several malignant diseases [17-20], we addressed the question whether it is also the case in CML-CP patients. As shown in Fig. 1C and in Supporting Information Fig. 4A, iNKT cells from CML-CP patients proliferated much less in response to their cognate ligand α -GalCer than their counterpart from HDs (mean \pm SEM: 2.2 \pm 0.8-fold versus 83.1 \pm 16.9-fold, respectively). This result was in accordance with the reduced proportion of cycling cells among the CML-CP iNKT cell population in the same culture conditions (Fig. 1D, and Supporting Information Fig. 4B). Once again, the defect was corrected in CML-CR patients having received IM and IFN-α therapy, in which iNKT cells increased 100-fold or 20-fold, respectively, upon exposure to a-GalCer. In contrast with iNKT cells, conventional T cells conserved their proliferative potential in CML-CP patients. Indeed, $V\beta 2^+$ polyclonal MHC class II-restricted T cells responded normally to the super-antigen TSST1 (Supporting Information Fig. 5A and B), and PBMCs stimulation with anti-CD3/CD28 beads revealed also no significant difference between CML-CP patients and HDs in terms of cell growth (Supporting information Fig. 5C).

The anergic status of iNKT cells is partially reversed by IM in vitro implicating BCR-ABL TK activity

The fact that iNKT cells from CML patients emerge from their anergic status after IM therapy suggests that BCR-ABL activity contributes to the functional defect of iNKT cells. In accordance with this notion, in vitro culture of PBMCs with the TK inhibitor IM led to a significant improvement of the proliferation rate of iNKT cells from CML-CP patients with a 2- to 50-fold increase induced by IM (Fig. 2A). The fact that in the same experimental set up the number of iNKT cells recovered remained virtually unchanged in HDs reflects the selective sensitivity of CP patients to IM. However, it should be noted that exposure to IM in vitro restored the proliferative capacity of iNKT cells from CML-CP patients only partially. This result, together with our demonstration that both IM therapy and IFN- α therapy reversed the anergic status of iNKT cells suggests the involvement of complex immunoregulatory mechanisms rather than the sole direct inhibition of BCR-ABL activity in hematopoietic cells. Consistent with this view, the expression of Ph chromosome in T cells is commonly considered a very rare event. Also, we found that TK activity assessed by cytometry analysis of intra-cytoplasmic phospho-tyrosine levels was modified neither in iNKT cells nor in T cells from CML-CP patients, relative to their counterpart from HDs, while it was clearly enhanced among the CD34+ myeloid progenitor subset (Fig. 2B and C). Moreover, in vitro treatment with IM had no effect on phospho-tyrosine MFI in iNKT cells and T cells from both CML-CP and HDs, while it led to a substantial decrease in CD34⁺ cells from CML-CP patients. These results argue against a direct autonomous action of BCR-ABL in iNKT cells.

© 2012 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim



Figure 2. BCR-ABL TK activity in iNKT cells and CD34⁺ cells: influence of IM treatment in vitro. (A) PBMCs from CML-CP patients (n = 4) or HDs (n = 4) were cultured, as described in Fig. 1, in the presence or absence of IM (0.5 or 1 μ M), iNKT cell fold expansion for each condition was calculated as described in Fig. 1 and plotted on the graph for each individual donor. 'p = 0.05 between CP and HDs. Mann-Whitney nonparametric test. (B) PBMCs from CML-CP patients and HDs were cultured for 20 h in the presence or absence of IM (1 μ M). Cells were membrane-labeled with anti-CD3-FE-Cy5 and a-GalCer-loaded CD1d TT-allophycocyanin, anti-Va24-PE and a-GalCer-loaded CD1d TT-allophycocyanin, anti-P-Tyr mAb (mouse IgG2b) and a FITC polyclonal Ab anti-mouse IgG2b. Analysis was performed by flow cytometry gating on Va24⁺ a-GalCer-loaded CD1d TT⁺ cells or CD34⁺ tells. One representative result out of four CML-CP patients on five HDs is shown. Numbers indicate P-Tyr MFI values with IM or without IM (bold numbers). (C) PBMCs from CML-CP patients (n = 4) or HDS (n = 5) were cultured in the presence or absence of IM (1 μ M) and tyrosine phosphorylation (P-Tyr) was analyzed after gating on iNKT cells and CD34⁺ cells. GD3⁺ cells. Sudent 'responsent and plotted for each individual sample; horizontal bars represent the mean. 'p < 0.05. Student t-test. Data are representative of four to five experiments.

Anergy is associated withintrinsic and APC-dependent functional deficiencies of iNKT cells during CML-CP

The anergic status of iNKT cells during CP CML might be an indirect effect resulting from BCR-ABL expression in some APCs required for activation. Indeed, several functional defects

(including inefficient actin polymerization and antigen processing) have previously been reported in myeloid DCs from CML patients [22]. Consistent with this hypothesis, we found that α -GalCer-loaded ex vivo-generated monocyte-derived DCs obtained from CML-CP patients were unable to ensure optimal expansion of a HD-derived iNKT cell line, conversely to their counterpart from HDs (Supporting Information Fig. 6). These findings along with the fact that in vitro exposure to IM did not completely restore normal iNKT cell proliferation led us to assume that total reversal of the anergic state requires activation and/or maturation steps for which APCs are critical. Furthermore, we showed that intrinsic modifications underlie the BCR-ABL-dependent anergy of iNKT



Figure 3. Analysis of TCR- and non-APC-dependent proliferation of iNKT cells, as well as their PLZF and IL-4 expression in CML patients and HDs. (A) A total of 2×10^5 PBMCs from CML-CP patient, IM-treated CML-CR patients, or HDs were stained with carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) and then incubated with anti-CD3/CD28 beads for 7 days. Expression of CFSE was analyzed after gating on CD3⁺ 6B11 cells. The frequency of dividing cells among iNKT cells was determined for CML-CP patients (29.7 \pm 8%, n = 7), HDs (65.5 \pm 4%, n = 7), and IM-treated CML-CR patients (49.6 \pm 3%, n = 4). (B) PBMCs from CML-CP patients tients, IM- or IFN-α-treated CML-CR patients, or HDs were membrane labeled with anti-CD3-PerCP-Cy5 and anti-iNKT-PE 6B11 clonotype, fixed, permeabilized, and stained with anti-PLZF mAb as previously described [10]. PLZF expression was analyzed after gating on CD3⁺ 6B11+ cells. iNKT cell PLZF MFI/total T-cell PLZF MFI ratio for each CML-CP patient ($0.89 \pm 0.1\%$, n = 7), IM-treated ($1.86 \pm 0.2\%$, n = 6) or IFN- α -treated ($2.12 \pm 0.5\%$, n = 5) CML-CR patient, or HDs ($3.03 \pm 0.5\%$, n = 8). (C, D) PBMCs from CML-CP patients, IM- or IFN- α -treated CML-CR patients, or HDs were stimulated for 5 h with PMA/ionomycin in the presence of monensin. Cells were membrane-labeled with anti-Va24-PE mAb (or Va24-FITC mAb) and α -GalCer-loaded CD1d TT-allophycocyanin, permeabilized with Cytofix/CytopermTM kit and stained with anti-IFN-γ-FITC (or anti-IL-4-PE, respectively). (C) Intracellular expression of IFN- γ and IL-4 was analyzed after gating on V α 24+ α -GalCer-loaded CD1d TT⁺ cells. The frequency (%) of IL-4-expressing cells among iNKT cells was determined for CML-CP patients (3.15 \pm 2%, n = 6), HDs (11.0 \pm 3%, n = 8), IM-treated (11.8 \pm 3%, n = 11), and IFN- α -treated (32.2 \pm 11%, n=6) CML-CR patients. (D) IFN- γ expressing cell frequencies among iNKT cells were determined for HDs (67.6 \pm 7%, n=8), CML-CP patients $(73.2 \pm 8\%, n = 6)$, IFN- α -treated patients $(39.2 \pm 11\%, n = 6)$, and IMtreated patients (72.3 \pm 7%, n = 12). Each symbol represents data from one donor/patient; horizontal bars represent the mean. Values indicated are mean \pm SEM. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001. Mann–Whitney nonparametric test. ND: not done

© 2012 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

cells from CML-CP patients (Fig. 3, and Supporting Information Fig. 7). Indeed, these cells proliferated less in response to anti-CD3/CD28 beads, which provide TCR-dependent stimulation that bypasses APCs, than their HDs counterpart. In the same line of evidence, PLZF, a transcription factor requisite for the differentiation and maintenance of functional iNKT cells failed to be expressed in cells from CML-CP patients (Fig. 3B). Lastly, in accordance with recent studies in mice showing that PLZF-deficient iNKT cells do not acquire the capacity to secrete IL-4 [10, 11], we observed the same modification in iNKT cells from CML-CP patients upon stimulation with PMA/ionomycin (Fig. 3C). These findings are consistent with the observation that the proliferative response of iNKT cells from CML-CP patients could not be restored in vitro by adding APCs from HDs (data not shown). Importantly, proliferation in response to anti-CD3/CD28 beads (Fig. 3A) as well as expression of PLZF and IL-4 (Fig. 3B and C) returned to normal when iNKT cells were recovered from patients who had achieved CR after IM or IFN-α therapy, confirming that the functional impairment during CP CML is reversible.

Taken together, our results show that iNKT cells in CML-CP patients have specifically lost their ability to proliferate in response to their cognate ligand and to exert their cytolytic functions through perforin and CD95L expression. Further investigations are required to elucidate the exact mechanism accounting for the effects of IM and IFN- $\!\alpha$ on these parameters. Nonetheless, our results suggest that the dysfunctions of iNKT cells are partly caused by defective APCs that are probably rescued by IM or IFN-a therapy, a view that is in agreement with a previous study reporting that ex vivo-generated monocyte-derived DCs from IM-treated CML-CP patients can activate iNKT cell lines with similar efficiency than their HDs counterpart [21]. As a-GalCer has already been used in clinical trials [23], our findings lead to propose that combination of IM with an immunotherapy using α-GalCer-pulsed auto DCs might become a new and useful strategy for targeting iNKT cells to restore their functions in CML-CP patients. However, the possibility that IM and/or IFN-a act(s) in part by enabling iNKT cells to exert their antileukemic effects should be investigated before using their ligands as a therapeutic strategy in CML.

Concluding remarks

The present study provides evidence that CP CML is associated with an acquired but potentially reversible defect in iNKT cells. Given the critical role of this innate cell population in tumor surveillance, our data reveal a new mechanism allowing leukemic cells to escape from an anti-CML immune response, and support the notion that iNKT cells play a role in controlling the disease in patients undergoing IM or IFN- α therapy.

Materials and methods

Patients

CML patients treated in the Oncology-Hematology and Cell Therapy Department and INSERM CIC-P-802 were included in this

study. Patients were divided into three groups according to their treatment and to their clinical status as follows: (i) 22 untreated patients studied at diagnosis (100% Ph+ mitosis in cytogenetic analysis); (ii) 23 patients currently treated with IM and who have achieved either complete cytogenetic remission (0% Ph+ mitosis in cytogenetic analysis of at least 20 mitosis) and major molecular response (BCR-ABL/ABL ratio at 0.1% in International Scale or the status of undetectable BCR-ABL in peripheral blood by RT-qPCR (undetectable molecular residual disease, UMRD). These cytogenetic and molecular responses are referred to as CR, and (iii) 14 patients who were initially treated with IFN-α and developed a sustained CR maintained at least 3 years after treatment discontinuation. The 24 HDs were volunteers from the Pôle Biologie Santé (Poitiers, France). An informed consent was obtained from patients and HDs. The study was approved by the local Institutional Review Board (CHU La Milétrie). Blood samples were collected on heparin and PBMCs were isolated and cultured as previously described [24].

Reagents

A total of 10 ng/mL IL-2 and 10 ng/mL IL-15 (R&D systems, Abingdon, UK), 100 ng/mL α-GalCer (Kirin Brewery, Gunma, Japan), 10 ng/mL TSST1 superantigen (Sigma-Aldrich, Lyon, France), and 0.5 or 1 µM IM (Glivec[™], Novartis, Rueil Malmaison, France) were used in this study. Anti-IFN-y-FITC, anti-IL-4-PE, anti-perforin-FITC, anti-CD34-PE, anti-CD3-PE-Cy5.5, anti-CD3-PerCP-Cy5.5, anti-CD4-FITC mAb, anti-iNKT-PE 6B11 clonotype, and anti-CD95L-allophycocyanin mAb were purchased from BD Biosciences (Le Pont de Claix, France) and Miltenyi Biotec SAS (Paris, France), respectively. Anti-CD8-PE-Cy7 was purchased from eBioscience (Paris, France). Anti-Va24-FITC, anti-Vβ2-FITC and anti-Vα24-PE, and anti-phosphotyrosine mAb (mouse IgG2b) and FITC polyclonal Ab anti-mouse IgG2b were purchased from Beckman Coulter (Villepinte, France) and Southern Biotechnology (Birmingham, AL), respectively. Anti-PLZF mAb (clone D-9, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) was coupled in our laboratory with Alexa Fluor 647 with a kit from Invitrogen (Cergy Pontoise, France). Allophycocyanin-conjugated CD1d-tetramer loaded with a-GalCer (a-GalCer-loaded CD1d TT-allophycocyanin) was provided by the NIH tetramer facility (Atlanta, GA, USA).

Flow cytometry analysis

Cells were analyzed by four-color flow cytometry (FACScalibur[™] and CellQuest[™] software, BD Biosciences) or six-color flow cytometry (FacsCanto II[™] and FacsDiva[™] software, BD Biosciences), and data were reanalyzed with FlowJo[™] (Treestar, Ashland, OR). For in vitro experiments, dead cells were excluded by propidium iodide staining. At least 105 viable cell events were acquired in the peripheral blood lymphocyte gate (assessed by forward and side scatter parameters). Positive staining for each

© 2012 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

marker was determined by comparison to appropriate isotypematched negative controls or nonloaded CD1d-TT.

Acknowledgments: We gratefully acknowledge the technical assistance of S. Noel. The authors are especially indebted to Elke Schneider and Michael Melkus for critically reviewing the manuscript and thank the NIH tetramer core facility for the α -GalCer-loaded CD1d-TT. Financial support came from INSERM, CHU de Poitiers, Université Paris Sud 11 (AAP \ll Attractivité \gg 2011), Université de Poitiers, Ligue contre le Cancer (Comité de la Vienne et Comité du Val-de-Marne), ARI-PC (Association pour la Recherche en Immunologie-Poitou-Charentes), and Ministère de la Recherche.

Conflict of interest: The authors declare no financial or commercial conflict of interest.

References

- 1 Goldman, J. M. and Melo, J. V., Chronic myeloid leukemia advances in biology and new approaches to treatment. N. Engl. J. Med. 2003. 349: 1451– 1464.
- 2 O'Brien, S. G., Guilhot, F., Gathmann, I., Baccarani, M., Cervantes, F., Cornellssen, J. J., Fischer, T. et al., Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. N. Engl. J. Med. 2003. 348: 994–1004.
- 3 Druker, B., Guilhot, F., O'brien, S. G., Gathmann, I., Kantarjian, H., Gattermann, N., Deininger, M. W. et al., Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukaemia. N. Engl. J. Med. 2006. 355: 2408–2417.
- 4 Molldrem, J. J., Lee, P. P., Wang, C., Felio, K., Kantarjian, H. M., Champlin, R. E. and Davis, M. M., Evidence that specific T lymphocytes may participate in the elimination of chronic myelogenous leukemia. Nat. Med. 2000. 6: 1018–1023.
- 5 Sacchi, S., Kantarjian, H., O'Brien, S. G., Cohen, P. R., Pierce, S. and Talpaz, M., Immune-mediated and unusual complications during interferon alfa therapy in chronic myelogenous leukemia. J. Clin. Oncol. 1995. 13: 2401–2407.
- 6 Steegmann, J. L., Requena, M. J., Martín-Regueira, P., De La Cámara, R., Casado, F., Salvanés, F. R. and Fernández Rañada, J. M., High incidence of autoimmune alterations in chronic myeloid leukemia patients treated with interferon-alpha. *Am. J. Hematol.* 2003, 272: 170–176.
- 7 Molldrem, J. J., Clave, E., Jiang, Y. Z., Mavroudis, D., Raptis, A., Hensel, N., Agarwala, V. et al., Cytotoxic T lymphocytes specific for a nonpolymorphic proteinase 3 peptide preferentially inhibit chronic myeloid leukemia colony-forming units. Biod 1997. 90: 2529-2534.
- 8 Nieda, M., Nicol, A., Kikuchi, A., Kashiwase, K., Taylor, K., Suzuki, K., Tadokoro, K. et al., Dendritic cells stimulate the expansion of bcr-abl specific CD8⁺ T cells with cytotoxic activity against leukemic cells from patients with chronic myeloid leukemia. Blood 1998, 91: 977–983.
- 9 Bendelac, A., Savage, P. B. and Teyton, L., The biology of NKT cells. Ann. Rev. Immunol. 2007. 25: 297–336.

- 10 Savage, A. K., Constantinides, M. G., Han, J., Picard, D., Martin, E., Li, B., Lantz, O. et al., The transcription factor PLZF directs the effector program of the NKT cell lineage. *Immunity* 2008. 29: 391–403.
- 11 Kovalovsky, D., Uche, O. U., Eladad, S., Hobbs, R. M., Yi, W., Alonzo, E., Chua, K. et al., The BTB-zinc finger transcriptional regulator PLZF controls the development of invariant natural killer T cell effector functions. Nat. Immunol. 2008. 9: 1055–1064.
- 12 Smyth, M. J., Crowe, N. Y., Pellicci, D. G., Kyparissoudis, K., Kelly, J. M., Takeda, K., Yagita, H. et al., Sequential production of interferongamma by NK1.1(+) T cells and natural killer cells is essential for the antimetastatic effect of alpha-galactosylceramide. Blood 2002. 99: 1259– 1266.
- 13 Nakui, M., Ohta, A., Sekimoto, M., Sato, M., Wakabe, K., Yahata, T., Kitamura, H. et al., Potentiation of antitumor effect of NKT cell ligand, alpha-galactosylceramide by combination with IL-12 on lung metastasis of malignant melanoma cells. Clin. Exp. Metastasis 2000. 18: 147–153.
- 14 Crowe, N. Y., Smyth, M. J. and Godfrey, D. I., A critical role for natural killer T cells in immunosurveillance of methylcholanthrene-induced sarcomas. J. Exp. Med. 2002. 196: 119–127.
- 15 Morris, E. S., MacDonald, K. P., Rowe, V., Banovic, T., Kuns, R. D., Don, A. L., Bofinger, H. M. et al., NKT cell-dependent leukemia eradication following stem cell mobilization with potent G-CSF analogs. J. Clin. Invest. 2005. 115: 3093–3103.
- 16 Tahir, S. M., Cheng, O., Shaulov, A., Koezuka, Y., Bubley, G. J., Wilson, S. B., Balk, S. P. et al., Loss of IFN-gamma production by invariant NK T cells in advanced cancer. J. Immunol. 2001. 167: 4046–4050.
- 17 Yanagisawa, K., Seino, K., Ishikawa, Y., Nozue, M., Todoroki, T. and Fukao, K., Impaired proliferative response of V alpha 24 NKT cells from cancer patients against alpha-galactosylceramide. J. Immunol. 2002. 168: 6494–6499.
- 18 Nowak, M., Arredouani, M. S., Tun-Kyi, A., Schmidt-Wolf, I., Sanda, M. G., Balk, S. P. and Exley, M. A., Defective NKT cell activation by CD1 d+ TRAMP prostate tumor cells is corrected by interleukin-12 with alphagalatosyl-ceramide. PLoS ONE 2010. 5: e11311.
- 19 Nieda, M., Nicol, A., Koezuka, Y., Kikuchi, A., Lapteva, N., Tanaka, Y., Tokunaga, K. et al., TRAIL expression by activated human CD4(+)V alpha 24NKT cells induces in vitro and in vivo apoptosis of human acute myeloid leukemia cells. Blood 2001. 97: 2067–2074.

- 20 Dhodapkar, M. V., Geller, M. D., Chang, D. H., Shimizu, K., Fujii, S., Dhodapkar, K. M. and Krasovsky, J., A reversible defect in natural killer T cell function characterizes the progression of premalignant to malignant multiple myeloma. J. Exp. Med. 2003. 197: 1667–1676.
- 21 Shimizu, K., Hidaka, M., Kadowaki, N., Makita, N., Konishi, N., Fu-Jimoto, K., Uchiyama, T. et al., Evaluation of the function of human invariant NKT cells from cancer patients using alpha-Galactosylceramide-loaded murine dendritic cells. J. Immunol. 2006. 177: 3484-3492.
- 22 Dong, R., Cwynarski, K., Entwistle, A., Marelli-Berg, F., Dazzi, F., Simpson, E., Goldman, J. M. et al., Dendritic cells from CML patients have altered actin organization, reduced antigen processing, and impaired migration. Blood 2003. 101: 3560–3567.
- 23 Nieda, M., Okai, M., Tazbirkova, A., Lin, H., Yamaura, A., Ide, K., Abraham, R. et al., Therapeutic activation of Valpha24+Vbeta11+ NKT cells in human subjects results in highly coordinated secondary activation of acquired and innate immunity. Blood 2004. 103: 383–389.
- 24 Rossignol, A., Barra, A., Herbelin, A., Preud'homme, J. L. and Gombert, J. M., Freshly isolated Valpha24(+) CD4(+) invariant natural killer T cells activated by alpha-galactosylceramide-pulsed B cells promote both IgG and IgE production. Chr. Exp. Immunol. 2007. 148: 555–563.

Abbreviations: α-GalCer: galactosylceramide - CML: chronic myeloid leukemia - CP: chronic phase - CR: complete remission - HD: healthy donor - IM: imatinib mesylate - iNKT cell: invariant NKT cell - Ph; Philadelphia chromosome - PLZF: promyelocytic leukemia zinc finger protein - P-Tyr: phospho-tyrosine - TK: tyrosine-kinase - TT: tetramer

Full correspondence: Dr. Jean-Marc Gombert, UMR INSERM S935, Pôle Biologie Santé, 1, rue George Bonnet BP633 86022 Poitiers Cedex, France Fax: +33-549443834

e-mail: j.m.gombert@chu-poitiers.fr

Received: 16/8/2011 Revised: 28/2/2012 Accepted: 11/4/2012 Accepted article online: 14/5/2012

© 2012 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Manuscrit 2

En révision à Journal of Pathology

Brief Definitive report

The Rho/ROCK pathway as a new pathological mechanism of innate immune subversion in chronic myeloid leukemia

Runing title: iNKT-cell immune subversion in chronic myeloid leukemia

Sara Basbous^{1,2}, Anaïs Levescot¹, Nathalie Piccirilli³, Françoise Brizard^{3,4}, François Guilhot^{2,3,4,5},

Lydia Roy⁵, Nicolas Bourmeyster⁶, Jean-Marc Gombert^{1,2,3,7}, André Herbelin^{1,2,3}

¹INSERM U1082, Poitiers, France

²Université de Poitiers, Poitiers, France

³CHU de Poitiers, Poitiers, France

⁴Service d'Hématologie et d'Oncologie Biologique, Poitiers, France

⁵INSERM-CIC 1402, Poitiers, France

⁶Laboratoire STIM CNRS – ERL7368, Poitiers, France

⁷Service d'Immunologie et Inflammation, Poitiers, France

Corresponding author: André Herbelin

Address, phone and Email: Inserm 1082, Pôle de Biologie Santé, 1, rue Georges Bonnet, 86022 Poitiers, France. Phone: (33) 5 49 45 43 41. Email: <u>andre.herbelin@inserm.fr</u>

Conflict of Interest: The authors declare no competing conflict of interest.

Abstract

CD1d-restricted iNKT cells are believed to play a key role in cancer immune surveillance and are functionally deficient in chronic myeloid leukemia (CML). Herein, we have hypothesized that this defect might originate from BCR-ABL-dependent dysfunctions in myeloid dendritic cells (mDCs). Indeed, flow cytometry and confocal microscopy revealed that cell-surface expression of CD1d was downregulated in CML mDCs, relative to healthy donor (HD) controls. The decreased cell-surface display of CD1d could not be ascribed to defective mDC differentiation, as attested by normal expression of HLA-DR and the CD86 maturation marker. On the other hand, reduced membrane expression was not associated with decreased intracytoplasmic levels of CD1d or its mRNA transcripts, consistent with intracellular retention. In vitro treatment of CML mDCs with the Rhoassociated protein Kinase (ROCK) inhibitor Y-27632, partially restored both cell-surface CD1d expression and CD1d-mediated antigen presentation, while it had no effect on HD mDCs. The inhibitor of BCR-ABL tyrosine kinase (TK), Imatinib-mesylate (IM), had no such activity. A similar recovery of CD1d expression occurred with fasudil, another ROCK inhibitor commonly used in clinical trials. Our data support the conclusion that BCR-ABL-dependent ROCK, but not TK, is involved in CD1d downregulation. We propose that ROCK, which is most likely activated by the DH/PH domain of BCR-ABL, mediates iNKT-cell immune subversion in CML patients by downregulating CD1d expression on CML mDCs. Our study reveals the ROCK/mDCs axis as a new potential target to restore immune surveillance in CML, offering new therapeutic perspectives for CML treatment.

Key words: Dendritic cells, CD1d, Chronic myeloid leukemia, Rho-associated protein kinase, iNKT cells

Introduction

Chronic myeloid leukemia (CML) is a myeloproliferative disorder initiated by the Philadelphia (Ph) chromosome generating the BCR-ABL oncoprotein, which gives rise to deregulated tyrosine kinase (TK) activity in leukemic cells [1]. TK activity residing within the ABL gene of BCR-ABL is generally considered sufficient to induce malignant transformation, while the DH-PH domain of the BCR component contributes to disease progression by activating the Rho/ROCK pathway implicated in the control of leukemia cell motility [2,3].

The ABL kinase inhibitor Imatinib-mesylate (IM) induces complete cytogenetic responses (CCR) in over 80% of newly diagnosed chronic-phase patients (CML-CP) [4]. However, this treatment does not eliminate all CML cells, and may fail because of clinical resistance, which requires for additional therapeutic strategies to eradicate all CML clones.

Several reports have supported a role of the immune system in the control of CML, even though the mechanisms of this anti-leukemic response remain unclear. We recently demonstrated that CML-CP is associated with functional deficiencies of invariant Natural Killer T (iNKT) cells [5]. These innate-like T cells expressing a semi-invariant T cell receptor (TCR) that recognizes glycolipid antigens presented by the evolutionarily-conserved CD1d molecule are believed to play a key role in cancer immunosurveillance [6].

Having shown that iNKT cells from CML-CP patients do not express the Ph chromosome [5], we investigated whether their anergic state resulted from BCR-ABL-dependent dysfunctions in myeloid dendritic cells (mDCs). We found that mDCs from CML-CP patients downregulated their CD1d cell surface expression, thereby impairing CD1d presentation to iNKT cells.
Materials and Methods

Patient and control donors. All patients and volunteers gave informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki for participation in the study which was approved by the Inserm CIC-1402 scientific committee (Poitiers, France).

Flow cytometric analysis. Cells were stained as previously described [5,7,8] and analyzed by sixcolor flow cytometry (FACSVerse TM and FacsDivaTM software, BD Biosciences), and data were reanalyzed with FlowJoTM Software (Treestar).

In vitro differentiation of mature mDCs from blood monocytes and treatment with inhibitors. Mature mDCs derived *in vitro* from blood monocytes, designated Mo-DCs, were generated from MACS enriched-CD14 cell fractions by incubation at $80x10^3$ cells/well into 96-well round (U)-bottom culture plates with IL-4 (10 ng/mL) and GM-CSF (25 ng/mL) for 3 days. The cells were differentiated in presence of 1µg/mL LPS for the last 18 hours of culture in presence of a ROCK inhibitor (Y-27632 or fasudil at 20µM) and/or IM (1µM) or medium alone.

Detailed methods are available in Supplemental Methods.

Results and Discussion

We postulated that BCR-ABL-dependent dysfunctions in mDCs might account for the anergic state of CML-CP iNKT cells we have recently reported [5]. Knowing that several tumors use CD1d downregulation to evade immune detection [9–12], we examined whether cell-surface CD1d was modified in CML-CP mDCs.

Cell-surface expression of CD1d is downregulated in peripheral blood mDCs from CML-CP patients, relative to healthy donors (HD)

Flow cytometry analysis of surface CD1d revealed that less than 20% CD11c(+) PBMCs gated *ex vivo* from CML-CP patients were CD1d(+) *versus* almost 50% HD mDCs (**Figure 1A, Figure 1B (left panel), Figure S1**). Moreover, CD11c(+) PBMCs from CML-CP patients expressed two-fold less surface CD1d than those recovered from HD (**Figure 1B, right panel**). For comparison, gated CD19(+) CML B cells, in which the expression of Ph chromosome is rare, displayed cell-surface CD1d levels similar to their HD counterparts, in terms of both frequency (**Figure 1C, Figure 1D (left panel**)) and mean fluorescence intensity (MFI) (**Figure 1D, right panel**), thereby corroborating BCR-ABL oncogene-mediated downregulation.

Reduced cell-surface expression of CD1d in CML-CP mDCs is not associated with decreased intracytoplasmic levels of CD1d or its mRNA transcripts

We analyzed the cellular distribution of CD1d molecules in CML-CP mDCs, using two-color CD1d staining to differentiate cell-surface from intracellular expression. CD1d localization in immature mDCs being mostly intracytoplasmic, mature and immature mDCs from CML-CP patients were examined separately according to their HLA-DR and CD11c expression (**Figure S2**).

CD1d remained mainly in the cytoplasm of immature mDCs from both HD and CML-CP patients, with barely detectable membrane expression in either population (Figure 2A, left panel). In mature mDCs from CML-CP patients, membrane CD1d was significantly downregulated *versus* their HD

counterparts, while intracellular levels were similar (Figure 2A, right panel). The decreased cellsurface display of CD1d cannot be ascribed to defective mDC differentiation, as attested by normal expression of HLA-DR and the CD86 maturation marker (Figure S3A&B). These finding together with those showing that BCR-ABL in DC does not influence HLA class I expression, suggest that the defect is specific to CD1d (Figure S3C). To corroborate our findings, we differentiated DCs in vitro from blood monocytes (referred to as Mo-DCs). Up to 98% of these cells were BCR-ABL positive when derived from CML-CP patients, as determined by FISH (Figure S4). As previously reported [13] and illustrated in Figure S5, mature Mo-DCs of CML-CP patients could not be distinguished from those derived from HD monocytes in terms of HLA-DR and CD86 co-stimulatory molecule expression. Less than 10% Mo-DCs from CML-PC patients expressed membrane CD1d, contrasting with more than 40% among those differentiated from HD monocytes (Figure 2B). This procedure provided highly enriched cells to address the mechanism accounting for the deficiency. Using confocal analysis of CML-CP Mo-DCs we found strong CD1d expression, mostly in the intracytoplasmic compartment (red spots), while only HLA-DR appeared on the cell surface (green spots). By contrast, CD1d and HLA-DR colocalized (yellow spots) close and attached to the membrane of HD Mo-DCs (Figure 2C). As previously described, Mo-DCs from CML-CP had a distinct morphology, with smaller, more rounded cells, indicative of altered actin organization [13]. These observations, together with CD1d mRNA expression that did not significantly differ between Mo-DCs from LMC-PC patients and HD (Figure 2D), are consistent with an intracellular retention of CD1d.

In vitro treatment of CML-CP Mo-DCs with Rho-associated protein Kinase (ROCK) inhibitors, but not IM, partially restores cell-surface CD1d expression.

We attempted to restore normal expression by treating CML-CP Mo-DCs with IM, which had no effect (**Figure 3A&C**), thereby excluding a major contribution of BCR-ABL TK activity. The Rho/ROCK pathway seemed another likely candidate, not only because it is constitutively activated by the DH-PH domain of BCR-ABL, but also having been identified as a negative regulator of CD1d-

mediated antigen presentation in cell lines *via* its effects on the actin cytoskeleton [14]. The proportion of CD1d(+) cells among Mo-DCs from CML-CP patients increased after treatment with the ROCK inhibitors Y-27632 (**Figure 3A and Figure S6**) and fasudil (**Figure S7**), while it remained unchanged in Mo-DCs from HD (**Figure 3B**), supporting a BCR-ABL-dependent effect of the ROCK inhibitors.

As illustrated by confocal analysis in **Figure 3C**, Y-27632 promotes re-expression of membrane CD1d, conversely to IM. It is also noteworthy that CML-CP Mo-DCs recovered a normal morphology which cannot be explained by a difference in the differentiation stage between CML and normal Mo-DCs. Indeed, surface expression of HLA-DR and the maturation marker CD86 were similar (**Figure S5**). Further investigations are needed to understand how CD1d retention is mediated. It would be particularly interesting to explore its relationship with actin disorganization in BCR-ABL(+) mDCs [13] through ROCK.

The ROCK inhibitor Y-27632 partially restored CD1d-mediated antigen presentation, conversely to IM.

To examine how decreased CD1d cell-surface expression affects antigen presentation, Mo-DCs from CML-PC patients were loaded with the iNKT cell ligand α -GalCer and then co-cultured with murine 2C12 iNKT cell hybridoma [15]. IL-2 production by 2C12 cells, used as a readout of CD1d-mediated TCR stimulation, reached–150-200 pg/mL when co-incubated with α -GalCer-loaded Mo-DCs from HD (**Figure 4A**). Production was significantly reduced when α -GalCer-loaded Mo-DCs from HD were replaced by their CML-CP counterparts (**Figure 4B**), suggesting that deficient CD1d membrane expression on mDCs might be the cause of the functional defect of iNKT cells in CML [5]. Accordingly, a direct correlation was found between CD1d expression on mDCs and function of autologous iNKT cells in CML-CP patients (**Figure 58**). Lastly, after treatment with Y-27632, α -GalCer-loaded CML-PC Mo-DCs partially recovered their capacity to stimulate iNKT cells in response to

autologous α -GalCer-loaded Mo-DCs (**Figure 4C**) was likewise restored *in vitro* with Y-27632, while the same treatment had no effect on HD Mo-DC (**Figure 4D**).

Given these data, we have concluded that ROCK, which is activated by the DH-PH domain of BCR-ABL, accounts for impaired cell-surface CD1d expression in mDCs from CML-CP patients, leading to innate immune evasion.

A role was previously ascribed to ROCK in control of leukemia cell motility and leukemic cell transformation mediated by the BCR/ABL TK and abnormal proliferation rise of human CML progenitor cells [16]. Here, we provide the first evidence that ROCK-mediated deregulation likewise affects BCR-ABL(+) immune cells, specifically the mDCs pool. Since Mo-DCs recovered normal morphology upon treatment with Y-27632, it can be assumed that downregulation of CD1d surface expression in mDCs from CML-CP patients is not the only consequence of dysfunctional ROCK. This raises the question of how these defects affect NK and/or T cell responses deficient in CML [17,18].

Our evidence for the implication of the ROCK/mDCs axis in immune surveillance offers new therapeutic perspectives for CML treatment by combining TKI and ROCK inhibitors. This approach could help to restore anti-tumor functions more efficiently and rapidly, thereby preventing drug resistance occuring during IM therapy alone and the consequences of treatment discontinuation. Since fasudil is well-tolerated by patients [19], this strategy can easily be implemented clinically.

Acknowledgments

We thank D. Elewaut for the 2C12 hybridoma cells. We gratefully acknowledge the technical assistance of A. Cantreau (ImageUp plateform, Université de Poitiers). The authors are especially indebted to E. Schneider for critically reviewing the manuscript of which the English was reviewed by Jeffrey Arsham, an American medical translator. This study was supported by INSERM, CHU de Poitiers, Université de Poitiers, Ligue contre le Cancer (Comité de la Vienne et de la Charente Maritime), Association pour la Recherche en Immunologie-Poitou-Charentes (ARIM-PC), Association Laurette Fugain (ALF 2015/10), and Ministère de la Recherche. S.B. was supported by grants from the Société Française d'Hématologie (SFH) and the Ligue contre le Cancer - Comité de la Vienne.

Statement of author contributions

S.B. designed the experiments, did the experiments, analyzed and interpreted the data, and wrote the manuscript. A.L. designed the experiments. N.P. provided assistance with cell cultures. F.B. performed the FISH assays. F.G and L.R. provided clinical samples and contributed to the interpretation of data. N.B. designed the experiments. A.H. and JM.G. together were responsible for the overall study design. A.H. supervised the project and took primary responsibility for writing the manuscript. The authors have no conflicting financial interests.

List of online supporting information

- Supplemental Methods S1.

- Figure S1: Gating strategy to define mDCs (CD11c(+) cells) on viable PBMCs.

- Figure S2: Combined flow cytometric analysis of surface and intracellular CD1d.

- **Figure S3**: CD86 and HLA-DR surface expressions were not affected in peripheral blood mDCs from CML-CP patients.

- Figure S4: Determination of Ph translocation in monocytes and Mo-DCs by FISH.

- Figure S5: Phenotypic profile of Mo-DCs generated *in vitro* from monocytes of CML-CP patients and HD.

- **Figure S6**: CD1d cell-surface re-expression on CML-CP Mo-DCs after a short-term *in vitro* treatment with the ROCK inhibitor Y27632.

- Figure S7: CD1d cell-surface expression of CML-CP Mo-DCs was improved after a short-term *in vitro* treatment with the ROCK inhibitor fasudil.

- **Figure S8**: Positive correlation between iNKT cell functions and CD1d cell-surface expression on CML-CP Mo-DCs *ex-vivo*.

References

1. Goldman JM, Melo JV. Chronic myeloid leukemia--advances in biology and new approaches to treatment. *N Engl J Med* 2003; **349**: 1451–64.

2. Harnois T, Constantin B, Rioux A, *et al.* Differential interaction and activation of Rho family GTPases by p210bcr-abl and p190bcr-abl. *Oncogene* 2003; **22**: 6445–6454.

3. Rochelle T, Daubon T, Troys MV, *et al.* p210bcr-abl induces amoeboid motility by recruiting ADF/destrin through RhoA/ROCK1. *FASEB J* 2013; **27**: 123–134.

4. Jabbour E, Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2016 update on diagnosis, therapy, and monitoring. *Am J Hematol* 2016; **91**: 252–265.

5. Rossignol A, Levescot A, Jacomet F, *et al.* Evidence for BCR-ABL-dependent dysfunctions of iNKT cells from chronic myeloid leukemia patients. *Eur J Immunol* 2012; **42**: 1870–1875.

6. Bendelac A, Savage PB, Teyton L. The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol* 2007; **25**: 297–336.

7. Hodge S, Hodge G, Flower R, *et al.* Surface and intracellular interleukin-2 receptor expression on various resting and activated populations involved in cell-mediated immunity in human peripheral blood. *Scand J Immunol* 2000; **51**: 67–72.

8. Jacomet F, Cayssials E, Basbous S, *et al.* Evidence for eomesodermin-expressing innate-like CD8(+) KIR/NKG2A(+) T cells in human adults and cord blood samples. *Eur J Immunol* 2015; **45**: 1926–1933.

9. Spanoudakis E, Hu M, Naresh K, *et al.* Regulation of multiple myeloma survival and progression by CD1d. *Blood* 2009; **113**: 2498–2507.

10. Hix LM, Shi YH, Brutkiewicz RR, *et al.* CD1d-expressing breast cancer cells modulate NKT cell-mediated antitumor immunity in a murine model of breast cancer metastasis. *PloS One* 2011; DOI: 10.1371/journal.pone.0020702

11. Weinkove R, Brooks CR, Carter JM, *et al.* Functional invariant natural killer T-cell and CD1d axis in chronic lymphocytic leukemia: implications for immunotherapy. *Haematologica* 2013; **98**: 376–84.

12. Guo W, Dong A, Xing C, *et al.* CD1d levels in peripheral blood of patients with acute myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia. *Oncol Lett* 2014; **8**: 825–830.

13. Dong R, Cwynarski K, Entwistle A, *et al.* Dendritic cells from CML patients have altered actin organization, reduced antigen processing, and impaired migration. *Blood* 2003; **101**: 3560–7.

14. Gallo RM, Khan MA, Shi J, *et al.* Regulation of the actin cytoskeleton by Rho kinase controls antigen presentation by CD1d. *J Immunol Baltim Md* 1950 2012; **189**: 1689–1698.

15. Brossay L, Chioda M, Burdin N, *et al.* CD1d-mediated recognition of an alphagalactosylceramide by natural killer T cells is highly conserved through mammalian evolution. *J Exp Med* 1998; **188**: 1521–1528.

16. Burthem J, Rees-Unwin K, Mottram R, *et al.* The rho-kinase inhibitors Y-27632 and fasudil act synergistically with imatinib to inhibit the expansion of ex vivo CD34(+) CML progenitor cells. *Leukemia* 2007; **21**: 1708–1714.

17. Chen CI-U, Koschmieder S, Kerstiens L, *et al.* NK cells are dysfunctional in human chronic myelogenous leukemia before and on imatinib treatment and in BCR-ABL-positive mice. *Leukemia* 2012; **26**: 465–474.

18. Mumprecht S, Schürch C, Schwaller J, *et al.* Programmed death 1 signaling on chronic myeloid leukemia-specific T cells results in T-cell exhaustion and disease progression. *Blood* 2009; **114**: 1528–1536.

19. Shimokawa H, Hiramori K, Iinuma H, *et al.* Anti-anginal effect of fasudil, a Rho-kinase inhibitor, in patients with stable effort angina: a multicenter study. *J Cardiovasc Pharmacol* 2002; **40**: 751–761.



Figure 1: Surface CD1d expression by peripheral blood mDCs and B lymphocytes from CML-CP patients and HD. Surface CD1d expression among PBMCs was analyzed by flow cytometry after gating on mDCs (CD11c(+)) (**A&B**) or B (CD19(+)) cells (**C&D**) from HD (n=17 and n=6 for mDCs and B cells, respectively) and CML-CP patients (n=28 and n=6 for mDCs and B cells, respectively). (**A&C**) Representative histogram is shown for each group of HD and CML-CP patients. Numbers indicate % of CD1d-expressing cells. Filled histograms show isotype controls. (**B&D**) Frequency (%) (**left panels**) and Mean Fluorescence intensity (MFI) (**right panels**) values of CD1d-expressing cells among the population of interest of the cohort study are shown as means ± SEM from four separate experiments. (**B&D**) Mann-Whitney non-parametric test. ns: not significant; ***p<0.001.



Figure 2: Cellular localization of CD1d molecules in mDCs from CML-CP patients and HD. (A) Frequency of cells expressing intracytoplasmic or surface CD1d was measured by flow cytometry among PBMCs after gating on immature (CD11c(+) HLA-DR(-)) (left panel) or mature (CD11c(+) HLA-DR(+)) mDCs (right panel) from HD (n=4) and CML-CP patients (n=6); for details, see Supplemental Figure S3. (B) Frequency of cells expressing surface CD1d was measured by flow cytometry in DCs differentiated *in vitro* from blood monocytes, referred to as Mo-DCs (for details, see Material and Method section). HD (n=13); CML-CP patients (n=16). (C) Cellular localization of CD1d molecules in Mo-DCs. HLA-DR (green) and CD1d (red) images were acquired by confocal microscopy. The merged images display colocalization of HLA-DR and CD1d (yellow). Scale bar: 10 μ m. Images are shown of two separate preparations of normal Mo-DCs (HD1, HD2) and CML-CP Mo-DCs (CML-CP1, CML-CP2). Data are representative of four independent experiments. (D) CD1d mRNA levels were measured in Mo-DCs by real-time quantitative PCR and normalized to yield equivalent GAPDH expression. HD (n=5); CML-CP patients (n=5). Data shown are means \pm SEM from two separate experiments. (A, D) Mann-Whitney non-parametric test. ns: not significant; *p<0.05; ***p<0.001.



Figure 3

Figure 3: CD1d cell-surface expression of CML-CP Mo-DCs after a short-term *in vitro* treatment with the ROCK inhibitor Y-27632. (A&B) Frequency of cells expressing surface CD1d was measured by flow cytometry on IM and/or Y-27632-treated Mo-DCs from CML-CP patients (n=16) (A) or HD (n=13) (B). Dotted lines represent mean frequency values in CML-CP Mo-DCs (A) and HD Mo-DCs (B) incubated with medium alone (NT). (C) Cellular localization of CD1d molecules in IM and/or Y-27632-treated or NT Mo-DCs. HLA-DR (green) and CD1d (red) images were acquired by confocal microscopy. Scale bar: 10 μ m. Images are shown of Mo-DCs from a representative CML-CP patient (CML-CP3) out of three. (A-B) Wilcoxon non-parametric test; ns: not significant; *p<0.05; **p<0.01**p<0.01; ***p<0.001.





Figure 4: Improvement of CML-CP Mo-DCs stimulatory effect on iNKT cells after treatment with the ROCK inhibitor Y-27632. (A-B) Y-27632 partially restored CD1d-mediated presentation to iNKT cell hybridoma, conversely to IM. IM and/or Y-27632-treated or NT (no treatment) Mo-DCs ($25x10^3$ cells) from HD (n=5) (A) or CML-CP patients (n=7) (B) were pulsed with 25 ng/mL of the iNKT cell ligand α -GalCer for 16 hours and then co-cultured with iNKT 2C12 hybridoma ($50x10^3$) for 48 hours. Without exogenous α -GalCer stimulation, IL-2 release was virtually undetectable (lower than 10 pg/mL). IL-2 was evaluated in a sandwich ELISA (R&D Systems). Wilcoxon non-parametric test; ns: not significant; *p<0.05. (C-D) Improvement of CD1d-dependent CML-CP iNKT cell expansion when autologous CML-CP Mo-DCs were pretreated with the ROCK inhibitor Y-27632. Y-27632-treated or NT Mo-DCs ($50x10^3$) from HD (n=4) or CML-CP (n=5) were pulsed (or not) with 100 ng/mL of α -GalCer and co-cultured with autologous PBMCs ($200x10^3$) for 7 days. (C) Fold expansion was calculated by dividing the number of iNKT cells recovered from culture with α -GalCer-loaded Mo-DCs by the number recovered from culture with non-loaded Mo-DCs. (D) Fold expansion values without Y-27632. (C-D) Mann Whitney non-parametric test; *p<0.05; **p<0.01.



Gating strategy to define mDCs (CD11c(+) cells) on viable PBMCs. Cells from healthy donors (HD) (upper panel) and CML patients at diagnosis (CML-CP) (lower panel) were stained with a viability dye (LIVE/DEAD marker Molecular probes NearIR) to allow exclusion of dead cells. mDCs were identified as Lin- (CD3(-) CD19(-) CD14(-)) CD11c(+). Numbers represent the frequency (%) of cells within the indicated gate.



Combined flow cytometric analysis of surface and intracellular CD1d. Staining with antibodies to human CD1d coupled with PE was performed prior to permeabilization (Cytofix/Cytoperm kit, BD biosciences) and staining with antibodies to CD1d coupled with APC. Representative flow cytometry plots showing localization of CD1d on immature (HLA-DR(-)) or mature (HLA-DR(+)) mDCs (CD11c(+) cells) of a healthy donor. PE(+)APC(+) quadrant: cell-surface CD1d localization. PE(-)APC(+) quadrant: intracytoplasmic CD1d localization. The frequency (%) of surface CD1d-expressing cells (upper right quadrant) and intracytoplasmic CD1d-expressing cells (upper left quadrant) are indicated in each plot.



CD86, HLA-DR and HLA-ABC surface expressions were not affected in peripheral blood mDCs from CML-CP patients. Percentages of CD86 (A), HLA-DR (B), and HLA-ABC (C) positive cells among CD11c(+) cells from HD (n=6) and CML-CP (n=5) were measured by flow cytometry *ex-vivo*. Data shown are means \pm SEM from two separate experiments. Mann-Whitney non-parametric test; ns: not significant.

Figure S4



Determination of Ph translocation in monocytes and Mo-DC by FISH. CD14-positive monocytes selected from PBMC using the MACS technique and Mo-DCs generated *in vitro* from monocytes of CML-CP patients and HD were hybridized with the BCR probe and ABL probe for detection of Ph chromosome. Normal cells (HD) display 2 red signals (presenting the ABL probe) and 2 green signals (presenting the BCR probe), and abnormal CML-CP cells with Ph translocation show two yellow signals (presenting fusion of the BCR and ABL probe); a single green signal and a single red signal. Images are shown of 2 independent preparations. The cells were examined with axioplan 2 imaging microscopy. Arrows indicate Ph translocation (yellow signal).



Phenotypic profile of Mo-DCs generated *in vitro* from monocytes of CML-CP patients and HD. Mo-DCs were generated from MACS enriched-CD14 cell fractions by incubation with IL-4 and GM-CSF for 3 days and matured with 1 μ g/ml LPS for the last 16-18 hours of culture. Phenotypic validation of Mo-DCs was performed by analysis of percentages of cell-surface CD86-expressing cells (**panel A**) and HLA-DR-expressing cells (**panel B**) among CD11c (+) cells of HD (n=5) and CML-CP patients (n=9). Data shown are means ± SEM from two separate experiments. Mann-Whitney nonparametric test; ns: not significant.



CD1d cell-surface re-expression on CML-CP Mo-DCs after a short-term *in vitro* **treatment with the ROCK inhibitor Y27632.** Mo-DCs from CML-CP patients treated *in vitro* was stained with CD1d antibody. The frequency of CD1d-positive cells among Mo-DCs and the treatment condition are indicated in each gate. Data are representative of six separate experiments.



CD1d cell-surface expression of CML-CP Mo-DCs was improved after a short-term *in vitro* treatment with the ROCK inhibitor fasudil. Cell-surface expression of CD1d on IM and/or fasudil (20 μ M)-treated or untreated (NT) Mo-DCs from CML-CP patients (n=9) was measured by flow cytometry. Data shown are means ± SEM from two separate experiments. Wilcoxon non-parametric test; ns: not significant; *p<0.05; **p<0.01



Positive correlation between iNKT cell functions and CD1d cell-surface expression on CML-CP mDCs *ex-vivo*. The percentage of mDCs expressing CD1d and the percentage of iNKT lymphocytes (CD3(+)6B11(+) cells) expressing PLZF (A) or perforin (B) were analyzed *ex-vivo* by flow cytometry within PBMCs of CML-CP patients (n=12) at diagnosis. Statistical analysis was evaluated using the Spearman test.

Supplemental Methods

<u>Samples</u>

Venous blood from healthy donors (HD) or CML-CP patients at diagnosis was collected on heparin (Oncology-Hematology Department, Poitiers, France). Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from blood samples, resuspended in 90% fetal calf serum with 10% DMSO, and placed in a controlled rate freezer for cryopreservation at -80°c until use.

Reagents

IL-4, GM-CSF, IL-2, IL-15 and the IL-2 sandwich ELISA were from R&D Systems._LPS, Y-27632 and fasudil were from Sigma Aldrich. IM (Glivec) and α -GalCer were from Novartis and Enzo Life science, respectively.

Flow cytometric analysis

Cells were analyzed with the following fluorescent antibodies: anti-CD1d-PE, anti-CD1d-APC, anti-CD11c-BV421, anti-CD3-PerCPCy5.5, anti-CD1-PerCPCy5.5, anti-CD86 PE, anti-HLA-DR-APC, anti-HLA-ABC-APC, and anti-perforin FITC (all from BD Biosciences), anti-CD1c-FITC (Miltenyi Biotec), anti-CD14-PECy7, and anti-PLZF-PE (all from eBiosciences), and anti-iNKT 6B11-APC clonotype (Biolegend). For intracellular staining of CD1d, perforin and PLZF, cells were permeabilized using Cytofix/Cytoperm kit (BD Biosciences), and then incubated for 30 minutes à 4°C with the fluorescent antibodies indicated at predetermined optimal concentrations. Cells were stained with a viability dye (LIVE/DEAD marker Molecular probes) to allow exclusion of dead cells. A minimum of 1x10³ viable cell events was acquired in the population of interest. Positive staining for each marker was determined by comparison with appropriate isotype-matched negative controls.

Monocyte and Mo-DC enrichment

CD14-positive monocytes were positively selected using the MACS technique (Miltenyi Biotec) according to the manufacture's protocol with anti-CD14 coated immunomagnetic beads. Facs analysis revealed a population enriched for monocytes (98%) after purification. After *in vitro* differentiation of mature mDC from blood monocytes, flow cytometry analysis revealed a 90-95% pure mDC population expressing CD11c.

Cell culture and iNKT cell expansion assays

For *in vitro* differentiation of mature mDC from blood monocytes and iNKT cell/Mo-DC coculture assays, cells were incubated in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum and antibiotics. For iNKT cell expansion assays, Mo-DC were pretreated or not with Y-27632, pulsed (or not) with α -GalCer (100 ng/ml) and fixed in 0.05% paraformaldehyde prior to addition (50x10³/well) to autologous PBMC (200x10³/well) in the presence of IL-2 (10 ng/mL) and IL-15 (10 ng/mL). After 7 days, fold expansion was calculated by dividing the number of iNKT cells recovered from culture with α -GalCer-loaded Mo-DC by their number recovered from culture with non-loaded Mo-DC.

T cell Hybridoma

Murine iNKT cell hybridoma 2C12 (provided by D. Elewaut, Department of Rheumatology, Laboratory for Molecular Immunology and Inflammation, Ghent University Hospital, Belgium) was derived from C57BL/6 NK1.1⁺ thymocytes, as described in (4). Cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) – high glucose (Gibco by Life Technologies) supplemented with 10% fetal bovine serum, and were authenticated by their capacity to produce IL-2 in response to a CD1d-mediated TCR stimulation by the iNKT cell ligand α -GalCer (for details, see Figure 4A). In each experiment, 2C12 hybridoma-TCR β expression was assessed using the anti-TCR β (Clone H57-597, BD Bioscience) by flow cytometry, in order to verify that the cells had not internalized their TCR.

Confocal microscopy

Mo-DC from HD or CML-CP patients were washed in PBS 1X, and fixed in 4% paraformaldehyde. The cells were incubated with primary antibodies: anti-human DR (mouse IgG2A, clone L243) and anti-human CD1d (mouse IgG2b, clone 51.1) (from Biolegend) for 1 hour. After blocking the free reactive sites with PBS1X-1%SVF, the cells were stained with secondary conjugate antibodies: AF488-goat anti-mouse IgG2A and AF555-goat anti-mouse IgG2b antibodies (from Invitrogen). Images were acquired by confocal microscopy with an Olympus FV1000.

<u>RT-qPCR</u>

Total RNA was extracted using the RNA Extraction kit (QIAGEN). First-strand cDNAs were reversely transcribed from 2.0 µg RNA using superscript II first-strand cDNA synthesis kit (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. For PCR amplification of CD1d, the forward 5'GGAATTCGCCAAAATGCTAC3' and reverse 5'TTGGGCTTCACTTGCTTCTT3' primers were used under the following conditions: 95°C for 1 minute, 56°C for 1 minute, and 72°C for 1 minute, for a total of 35 cycles.

Fluorescent in situ hybridization (FISH) analysis

Monocytes and Mo-DC were hybridized with the BCR probe and ABL probe (Metasystems) for detection of Ph chromosome. Prior to hybridization, cells were fixed in Carnoy's solution (ethanol/acetic acid). Slides were prepared with a minimum of 200 cells in interphase and FISH was performed according to the manufacturer's protocol. After hybridization, cells were washed in PBS/SSC and were place in mounting medium contained DAPI marker. The cells were examined with axioplan 2 imaging microscopy.

Statistical analysis

All statistical analyses used GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad software Inc.). The statistical significance of differences in mean values was analyzed by the two-tailed Mann-Whitney or Wilcoxon non-parametric test. Results were considered to be statistically significant when p-value was <0.05.

Manuscrits 3 et 4

II- Caractérisation d'une nouvelle population de lymphocytes T CD8⁺ innés chez l'homme adulte sain : mise en évidence de son déficit au cours de la LMC

Comme nous l'avons évoqué précédemment, nous avons mis en évidence une altération fonctionnelle des cellules iNKT au cours de la LMC comprenant en particulier un défaut d'expression du facteur de transcription PLZF, accompagné d'une forte diminution de production d'IL-4. Or, Il est connu que ces deux facteurs interviennent chez la souris dans la maturation des cellules T CD8⁺ innées. Nous avons posé les questions successivement de l'existence d'une population T CD8⁺ innée chez l'homme sain et de son défaut éventuel au cours de la LMC.

Nous avons documenté chez l'homme adulte l'existence d'une nouvelle population T CD8⁺ ayant des caractéristiques « innate-like » équivalentes à celles décrites chez la souris (Manuscrit 3). Ces cellules sont KIR/NKG2A⁺, expriment fortement le facteur de transcription Eomes et ont un phénotype mémoire de type EMRA. Elles ont des fonctions cytotoxiques et produisent l'IFN- γ en réponse à une stimulation de type innée par la combinaison des cytokines IL-12 et IL-18. De manière intéressante, nous avons mis en évidence que cette population est présente dans le sang de cordon, montrant le caractère inné de ces cellules que nous avons dénommée « T CD8⁺ innées ».

L'ensemble de ces résultats joint à la prise en compte de l'importance de l'IL-4 des cellules iNKT dans la génération de la population T CD8⁺ innée chez la souris, nous a permis de postuler l'existence d'une altération fonctionnelle de cellules T CD8⁺ innées au cours de la LMC (Manuscrit 4). Nous avons pu ainsi montrer une corrélation entre l'expression de PLZF dans les cellules iNKT et l'expression d'Eomes dans les cellules T CD8⁺ innées. Par ailleurs, les cellules T CD8⁺ innées sont déficientes sur le plan numérique et fonctionnel chez les patients LMC en phase chronique avec une restauration partielle observée chez les patients traités avec IM. Ces résultats suggèrent que la population T CD8⁺ nouvellement décrite chez l'homme joue un rôle important dans l'immunité anti-tumorale.

Manuscrit 3

1926 Florence Jacomet et al.

Frontline

DOI: 10.1002/eji.201545539

Eur. J. Immunol. 2015. 45: 1926-1933

Immunology

FRONTLINE

Evidence for eomesodermin-expressing innate-like CD8⁺ KIR/NKG2A⁺ T cells in human adults and cord blood samples

Florence Jacomet^{1,2,3,4}, Emilie Cayssials^{1,3,4}, Sara Basbous^{1,4}, Anaïs Levescot^{1,5,6}, Nathalie Piccirilli³, Deborah Desmier^{1,3,4}, Aurélie Robin^{3,6}, Anne Barra^{1,2,3,4}, Christine Giraud^{1,3,7}, François Guilhot^{3,4,8,9}, Lydia Roy^{3,4,8,9}, André Herbelin^{*3,4,6} and Jean-Marc Gombert^{*1,2,3,4}

- ² Service d'Immunologie et Inflammation, Poitiers, France
- ³ CHU de Poitiers, Poitiers, France
- ⁴ Université de Poitiers, Poitiers, France
- ⁵ Université Paris-Sud 11, Orsay, France
- ⁶ INSERM 1082, Poitiers, France
- ⁷ Etablissement Français du Sang Centre-Atlantique, Site de Poitiers, Poitiers, France
- ⁸ Centre d'investigation clinique INSERM-1402, Poitiers, France
- ⁹ Service d'Oncologie Hématologique et Thérapie Cellulaire, Poitiers, France

Polyclonal CD8⁺ T cells, with a marked innate/memory phenotype, high eomesodermin (Eomes) expression, and the capacity to generate IFN-y rapidly without prior exposure to antigen, have been described in mice. However, even though a pool of human CD8+ T cells expressing killer Ig-like receptors (KIRs) was recently documented, the existence of a human equivalent of murine innate/memory CD8+ T cells remains to be established. Here, we provide evidence for a population of KIR/NKG2A+CD8+ T cells in healthy human adults sharing the same features, namely increased Eomes expression, prompt IFN-y production in response to innate-like stimulation by IL-12+IL-18, and a potent antigen-independent cytotoxic activity along with a preferential terminally differentiated effector memory phenotype. None of the above functional characteristics applied to the KIR/NKG2A⁻ fraction of the Eomes⁺CD8⁺ T-cell population, thereby underlining the ability of KIR/NKG2A to distinguish between "innate/memory-like" and "conventional/memory" pools of CD8+ T cells. Remarkably, KIR/NKG2A+Eomes+CD8+ T cells with innate-like functions and a memory/terminally differentiated effector memory phenotype were also identified in human cord blood, suggesting that their development did not depend on cognate antigens. Taken together, our results support the conclusion that CD8⁺ T cells co-expressing Eomes and KIR/NKG2A may represent a new, functionally distinct "innate/memory-like" subset in humans.

Keywords: Innate-memory T cells • Innate immunity • CD8+ T cells • Cord blood • Human



See accompanying Commentary by Luc Van Kaer



Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site

Correspondence: Dr. Jean-Marc Gombert e-mail: jean-marc.gombert@chu-poitiers.fr *These authors contributed equally to this work as senior authors.

© 2015 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

¹ INSERM UMR S935, Poitiers and Villejuif, France

Introduction

The term "innate T cell" was first assigned to a distinct lineage of murine T cells with a memory phenotype that develops in the thymus and rapidly secretes large amounts of cytokines upon TCR stimulation. This population includes cells restricted by MHC class Ib molecules, with limited tissue distribution and polymorphism [1]. Several polyclonal CD8+ T-cell subsets have subsequently been described in mice deficient in Itk kinase, T-cell signaling molecules or transcription factors, with functional and phenotypic features similar to those characterizing innate T cells [1-4]. Finally, the developmental regulation of innate CD8⁺ T cells occurs in inbred mouse strains, thereby proving its physiological relevance [3]. In this regard, they resemble virtual memory T cells [5, 6], which likewise display a marked innate/memory CD8 phenotype associated with pronounced expression of the transcription factor eomesodermin (Eomes). Moreover, they share their capacity to rapidly produce large amounts of IFN-y in response to innate-like stimulation by IL-12+IL-18 with NK cells [7, 8]. Even though their involvement in the control of bacterial infections has been demonstrated in two studies [6, 7], the actual physiological significance of innate/memory CD8+ T cells has not yet been clearly established.

To date, it is uncertain whether an equivalent of these innate CD8⁺ T cells exists in humans. Although human CD8⁺ T cells expressing killer cell Ig-like receptors (KIR) have been described [9–11], it is not known whether they express a marked innate/memory phenotype together with high levels of Eomes or innate functions, such as rapid TCR-independent IFN- γ production. We have addressed this issue in the present study, which provides strong evidence of the existence of innate-like CD8⁺ T cells in humans.

Results and discussion

Eomes-expressing innate-like CD8⁺ T cells are detected in adult humans

While human CD8⁺ T cells with a marked NK-like (CD56, KIR, NKG2A) phenotype have been identified in PBMCs [9–11], their Eomes expression pattern has not been assessed. We found that 7.5% of total CD8⁺ T cells from healthy adults expressed KIR and NKG2A (Supporting Information Fig. 1), which is similar to the previously reported proportion [9–11]. Remarkably, 55% of these NK-like CD8⁺ T cells expressed Eomes (Fig. 1A), which amounts to 2.5% of the total CD8⁺ T pool (Supporting Information Fig. 1). In comparison, only 24% of their KIR⁻/NKG2A⁻ counterparts and 26% of total CD8⁺ T cells were positive for the transcription factor (Fig. 1A). These data are consistent with a preferential link between Eomes expression and the NK-like phenotype in peripheral blood CD8⁺ T cells. Overall, the KIR/NKG2A⁺ fraction that expresses Eomes responded to IL-12+IL-18 by generating IFN- γ (Fig. 1B), as was the case in their murine "innate-memory"

© 2015 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

CD8+ T counterparts [7, 8]. The fact that this functional reactivity to IL-12+IL-18 was not found in the KIR/NKG2Afraction of the Eomes+CD8+ T cell population, clearly designates KIR/NKG2A molecules as a useful means of distinguishing between "innate/memory"-like and "conventional/memory" pools of CD8+ T cells in our experimental setup. As expected, the pool of Eomes-expressing cells, which presumably contains conventional effector CD8+ T cells, produced IFN-y upon TCR engagement, in accordance with the similar frequency of responder Eomes+CD8+ T cells in the KIR/NKG2A+ and KIR/NKG2Acell compartments (Fig. 1B). Finally, it turned out that the majority (nearly 60%) of CD8+ T cells that produced IFN-γ in response to IL-12+IL-18 co-expressed Eomes and KIR/NKG2A, as opposed to only 15-20% of those expressing either KIR/NKG2A or Eomes (Fig. 1C). Remarkably, nearly 60% of the Eomes+ subset among KIR/NKG2A+CD8+ T cells co-expressed T-box transcription factor (T-bet), whereas virtually all KIR/NKG2A-CD8+ T cells, including the minor fraction expressing Eomes, were T-bet- (Fig. 2A). Such a selective co-expression, which recalls the Eomes+T-bet+ CD8+ T-cell fraction that has been reported as confined in the pool of innate/memory CD8+ T cells in naïve mice [3], suggests that the two transcription factors might cooperate in promoting critical functions in the KIR/NKG2A+ CD8+ T-cell subpopulation. The co-expression also identifies the major IL-12+IL-18 responders among the CD8+ T-cell subset, thereby providing definite evidence of the existence of innate-like CD8+ T cells in adult humans.

Human Eomes⁺KIR/NKG2A⁺CD8⁺ T cells exert cytolytic activity in a TCR-independent manner

We next tried to determine whether human innate-like CD8+ T cells shared with NK cells the capacity to exert cytolytic activity in a TCR-independent manner. This was clearly the case, since KIR/NKG2A+Eomes+CD8+ T cells, but not their KIR/NKG2Acounterpart, were endowed with natural cytotoxicity both in an antibody-dependent manner through human CD16 as a lysis receptor and against MHC class I- human K562 target cells, as shown in a single-cell assay using CD107 expression as a surrogate marker for cytotoxicity (Fig. 1D). Consistently with the key role attributed to IL-15 as an essential mediator of peripheral NK cells [12-14], IL-15 prestimulation led to a significant increase of CD16-mediated natural cytotoxicity in Eomes+KIR/NKG2A+CD8+ T cells, presumably via induction of CD16 cell surface expression (unpublished observations). As to the cytoxicity against K562 target cells, Eomes+KIR/NKG2A+CD8+ T cells but not their Eomes+KIR/NKG2A- counterparts, induced degranulation.

Eomes⁺KIR/NKG2A⁺CD8⁺ T cells are terminally differentiated effector cells

Based on the phenotype of their murine equivalent, we hypothesized that cells exhibiting a memory phenotype should be highly



© 2015 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

represented within human innate-like CD8⁺ T cells. As illustrated in Figure 1E, among Eomes⁺CD8⁺ T cells, the KIR/NKG2A⁺ subset was enriched in CD45RA⁺CCR7⁻ effector cells, which represent the most differentiated type of memory cells, also called terminally differentiated effector memory (T_{EMRA}) [15], whereas the KIR/NKG2A⁻ subset primarily consisted in effector memory cells (CD45RA⁻CCR7⁻). Moreover, nearly 45% of KIR/NKG2A⁺ cells expressed CD57, as opposed to 15% in their KIR/NKG2A⁻ counterparts (Fig. 2B), thereby confirming that the KIR/NKG2A-expressing CD8 T-cell subset is preeminently terminally differentiated, in accordance with a recent report [9].

KIR/NKG2A⁺CD8⁺ T cells expressing high levels of Eomes preexist in human cord blood

Knowing that mouse "innate/memory" CD8+ T cell development occurs mostly in the thymus, we looked for human innate/memory-like CD8+ T cells in cord blood. In accordance with a recent study [16], we were able to identify KIR and NKG2A receptors in a small proportion (range 0.7-1.7%) of CD8+ T cells in cord blood (Fig. 3A). Similarly to those circulating in adult blood, they expressed Eomes preferentially, as compared with KIR/NKG2A-CD8+ T cells (Fig. 3A and B). Moreover, the KIR/NKG2A+Eomes+CD8+ T-cell fraction contained a sizable majority of TEMRA cells (Fig. 3C) even though, in contrast with adult blood, they were mainly CD57- (Supporting Information Fig. 2A). This finding is in agreement with the notion that despite their memory/TEMRA phenotype, KIR/NKG2A+ cells expressing Eomes in cord blood are less differentiated than those recovered from the blood of adult donors [16]. Like their peripheral counterparts, most cord blood KIR/NKG2A+Eomes+CD8+ T cells expressed T-bet (Supporting Information Fig. 2B) and produced IFN-y in response to stimulation by IL-12+IL-18 and PMA-ionomycin (Fig. 3D), thereby corroborating the conclusion that their innate functions had been acquired prior to exposure to

antigens in peripheral lymphoid organs. These data, along with previous identification of Eomes+CD8+ T cells in human fetal spleen [17], suggest that these cells might actively contribute to the innate immune response against various pathogens in the human perinatal period. In the mouse, a key role in Eomes upregulation has been attributed to promyelocytic leukemia zinc finger protein (PLZF) expressing T cells, such as iNKT cells through their IL-4 production [2, 3]. However, challenging this model, two recent studies support the view that IL-4 induces development of innate/memory CD8+ T cells in a $\gamma\delta$ T and iNKT cell-independent manner [18, 19]. Even though the mechanisms underlying the generation and/or maintenance of innate/memory CD8+ T cells in humans remain to be identified, our data in cord blood showing a close correlation between frequencies of Eomes-expressing KIR+CD8+ cells and PLZF relative MFI in CD3+ cells (Supporting Information Fig. 3) are consistent with a possible requirement of PLZF-expressing T cells.

More generally, based on our demonstration that peripheral KIR+Eomes+CD8+ T cells display innate functions, including cytotoxic activity and rapid IFN- γ production after exposure to proinflammatory cytokines, we hypothesize that this new subset may be involved during infection or tumorigenesis in humans. If this were so, a possible correlation between iNKT cell immune subversion and innate-like CD8+ T cell dysfunctions, and ultimately with disease burden, would be worth investigating.

Concluding remarks

Taken together, our results provide definite evidence for the existence of a new population of antigen-inexperienced CD8⁺ T cells in humans that are characterized by a marked innate/memory phenotype as well as NK-like functions. Their potential role in disease control in conjunction with iNKT cells, which have been documented for their antitumoral and anti-infectious activities [20–23], deserves future consideration.

Figure 1. Identification of Eomes-expressing innate-like CD8+ T cells in healthy adult humans. (A) Eomes expression among PBMCs was analyzed by flow cytometry after gating on total, KIR/NKG2A – and KIR/NKG2A+ CD8+CD3+ populations. One representative sample is shown (left). Eomes expression: gray solid lines; Isotype control: gray dotted lines. Numbers indicate the frequencies of Eomes-expressing cells. Cohort data are shown (n = 14). Wilcoxon-matched pairs test. "p < 0.001 (B–C) PBMCs were cultured for (B and C) 48 h with IL-12+IL-18 or (C) for 16 h with anti-CD2/CD28 beads. (B) IFN- γ expression was analyzed after gating on Eomes' CD8+ T cells and one representative sample is shown (left). The numbers indicate the frequencies of IFN- γ -expressing cells. Full cohort data are shown (right). The frequencies of IFN- γ -expressing cells (mean \pm SEM) after IL-12+IL-18 stimulation (n = 5) in KIR/NKG2A- ($1.7\% \pm 1.0$) and KIR/NKG2A+ ($25.4\% \pm 1.3$) CD8+CD3+ cell populations (left), and after TCR-dependent stimulation (n = 6) in KIR/NKG2A- ($6.2\% \pm 1.7$) and KIR/NKG2A+ ($25.4\% \pm 1.3$) CD8+CD3+ cell populations (left), and after TCR-dependent stimulation (n = 6) in KIR/NKG2A+ (faction, when cultured in medium alone, was lower than 1%. Paired t-test. "p < 0.001. (C) Eomes and KIR/NKG2A expression were analyzed among PBMCs after gating on IFN- γ -expressing cells. Wilcoxon-matched pairs test." p < 0.05. (D) PBMCs were preincubated for 48 h with IL-15 and cytotoxicity in the form of CD107a degranulation/expression was evaluated by flow cytometry. One representative sample is shown (left). Each histogram hows expressing cells. The full cohort data are shown (right). Frequencies of CD107a-expressing cells (mean \pm SEM; n = 6) in KIR/NKG2A- ($0.2\% \pm 0.1$) and KIR/NKG2A+ ($21.8\% \pm 5.9$) Eomes+CD8+CD3+ cell populations after CD16 stimulation (left graph), and in KIR/NKG2A- ($0.2\% \pm 0.1$) and KIR/NKG2A+ ($21.8\% \pm 5.9$) Eomes+CD8+CD3+ cell populations after CD16 stimulation (left graph), and in KIR/NKG2A-

© 2015 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim



Materials and methods

This section was written in compliance with minimal information about T-cell assays guidelines.

PBMCs and cord blood mononuclear cells (CBMCs)

Healthy adult individuals were volunteers from the Pôle Biologie Santé (Poitiers, France). Cord blood samples were provided by the Etablissement Français du Sang (Poitiers, France). The study

© 2015 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Figure 2. Analysis of expression of T-bet and CD57 by Eomes*KIR/NKG2A+CD8* T cells in adult peripheral blood. (A) Adult PBMCs were membrane-labeled with anti-CD3-BV421, anti-CD8-PECy7, and antipan-KIR/NKG2A.PE, fixed and permeabilized, and then stained with anti-Eomes-AF647 and anti-T-bet-PerCPCy5.5 for flow cytometric analysis. Intranuclear T-bet and Eomes expression was analyzed after gating on total, KIR/NKG2A- and KIR/NKG2A+ CD8-CD3+ cell populations. Dot plot graph: data are two representative samples out of eight evaluated. Numbers in each top right quadrant represent the percentages of cells co-expressing Eomes and T-bet among the indicated population. Cohort data: percentage of Eomes*T-bet+ cells (mean \pm SEM) in total (6.6 \pm 2.2), KIR/NKG2A- (5.1 \pm 1.7) and KIR/NKG2A+ (26.4 \pm 4.0) CD8+CD3+ cell populations. Wilcoxon nonparametric test. "p < 0.01, (B) Adult PBMCs (n = 6) were membrane-labeled with anti-CD3-BV421, anti-CD8-PECy7, anti-pan-KIR/NKG2A-PE, and anti-CD5-FITC, fixed and permeabilized, and then stained with anti-Eomes-AF647. Cell-surface expression of CD57 was analyzed after gating on Eomes+CD8+CD3+ cells coll the indicated populations. Numbers indicate the frequencies of CD57-expressing cells. Cohort data: percentage of CD57-expressing cells. (mean \pm SEM) in total (22.1% \pm 5.0), KIR/NKG2A+ (46.6% \pm 4.6) CD8+CD3+ cell populations. Wilcoxon nonparametric test." p < 0.05. Data have been pooled from three separate experiments.

was approved by the local Institutional Review Board. Peripheral and cord blood were collected in standard heparinized tubes, and PBMCs and cord blood mononuclear cells (CBMCs) were then separated by gradient centrifugation (Histopaque-1077, Sigma-Aldrich, St Louis, MO).

Reagents

Human rIL-12, rIL-18 (20 ng/mL together), and rIL-15 (10 ng/mL) were from R&D Systems (Abingdon, UK). PMA-ionomycin (1 ng/mL PMA, 0.5µg/mL calcium ionophore) and Dynabeads



Human T-activator CD3/CD28 were from Sigma-Aldrich and Invitrogen (Carlsbad, CA), respectively.

mAbs and flow cytometric analysis

Phenotypic analysis of PBMCs and CBMCs was performed by flow cytometry either ex vivo or after culture (1 \times 10⁶ cells/ mL). Expression of different markers was assessed by staining with appropriate combinations of mAbs conjugated directly to fluorochromes and directed against CD3, CD8, CD107a, T-bet, and IFN- γ from BD Biosciences (Le Pont de Claix, France); KIR2D+KIR3DL1/KIR3D1.2 (CD158e/k)+NKG2A (CD159a), referred to as pan-KIR/NKG2A, and CD45RA from MiltenyiBiotec (Bergisch Gladbach, Germany); CD16, CD57, and IFN- γ from Biolegend (San Diego, CA); Eomes from eBioscience (San Diego, CA); and CCR7 from R&D Systems. Dead cells were excluded by using the Live/Dead Fixable NearIR Dead Cell Stain kit (Life Technologies). For nuclear Eomes and/or T-bet staining and intracytoplasmic IFN- γ staining, cells were permeabilized with an anti-human Foxp3 staining kit (eBioscience) and

© 2015 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Figure 3. Eomes-expressing innate-like CD8 T cells preexist in cord blood. (A, B) Identification of Eomesexpressing KIR/NKG2A+CD8+T cells in CEMCS. (A) Two representative samples. Eomes and KIR/NKG2A expression was analyzed by flow cytometry after gating on CD8+CD3⁺ cells. Numbers represent the frequency of cells within the indicated quadrant. (B) Cohort data are shown (n = 4). Frequencies of Eomes-expressing cells (mean \pm SEM) in KIR/NKC2A⁻ ($2.7\% \pm 1.8$) and KIR/NKC2A⁺ ($36.6\% \pm 11.6$) CD8+CD3⁺ cell populations. Paired t-test. 'p < 0.05. (C) Cord blood KIR/NKC2A⁺ CD8⁺ T cells were evaluated for CD45RA and CCR7 expression by flow cytometry. The frequencies (mean \pm SEM; n = 4) of CD45RA⁺/CCR7⁻ (EMRA) cells among total, KIR/NKG2A⁻, and KIR/NKC2A⁺ Eomes⁺ CD8⁺CD3⁺ cell populations are $4.0\% \pm 1.2$, $15.2\% \pm 3.6$, and $41.7\% \pm 11.7$, respectively. Paired t-test. 'p < 0.05. (D) CBMCS were cultured for 48 h with IL-15 prior to stimulation with IL-12+IL-18 for 48 h or PMA-ionomycin for 4 h. Expression of IFN- γ was analyzed by flow cytometry after gating on CD8⁺CD3⁺ cells. One representative sample is shown for each mode of stimulation (IL-12+IL-18 and PMAionomycin, right). Each histogram represents expression of IFN- γ -expressing cells (mean \pm SEM) after IL-12+IL-18 stimulation (n = 6) in KIR/NKC2A⁺ (D8⁺CD3⁺ cells populations. Chort data are shown (right). Frequencies of IFN- γ -expressing cells (mean \pm SEM) after IL-12+IL-18 stimulation (n = 6) in KIR/NKC2A⁺ ($1.6\% \pm 0.7$) and KIR/NKC2A⁺ ($1.7.\% \pm 3.5$) populations (left graph), and after PMA-ionomycin stimulation (n = 6) in KIR/NKC2A⁺ ($10.2\% \pm 3.9$) and KIR/NKC2A⁺ ($3.5\% \pm 7.7$) populations (right graph). The frequency of IFN- γ expressing cells among KIR/NKC2A⁺ cells, when cultured in medium alone, was lower than 1%. Wilccoxon-matched pairs test. 'p < 0.05. (B–D) Each symbol represents one cord blood sample. Data have been pooled from two to three separate experiment

a Cytofix/Cytoperm kit (BD Biosciences), respectively [24]. Cells were analyzed by six- or eight-color flow cytometry (FACS Cantoll or FACSVerse cytometer and FACSDiva and FACSuite softwares, BD Biosciences), and data were analyzed using FlowJo Software (Treestar, Ashland, OR).

Cell cultures

All cell cultures (1×10^6 cells/mL) were performed in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated FCS and antibiotics. Cells were seeded into 24-well plates for IFN- γ assays or 96-well round (U) bottom culture plates for CD107a degranulation assays.

IFN-y analysis

To determine the intracytoplasmic expression of IFN- γ , PBMCs (1 \times 10⁶cells/mL) were cultured for 48 h in the presence or absence of IL-12 and IL-18. For stimulation with anti-CD3 and

▶ 1932 Florence Jacomet et al.

anti-CD28 antibodies, cells were incubated for 16 h with Dynabeads Human T-activator CD3/CD28 (Invitrogen) at the concentration recommended by the manufacturer. CBMCs $(1 \times 10^6$ cells/mL) were preincubated for 48 h with IL-15 prior to addition of IL-12 and IL-18 or PMA-ionomycin. To stimulate with PMAionomycin (1 ng/mL PMA, 0.5 µg/mL calcium ionophore, all from Sigma-Aldrich), CBMCs were incubated with medium alone for 44 h followed by 4 h of stimulation with the agent. Golgistop (BD Biosciences) was added in the last 4 h of culture.

CD107a degranulation assay

PBMCs were cultured for 48 h with rIL-15 prior to CD16triggering or incubation with K562 target cells. For anti-CD16 triggering, wells were precoated with 10 μ g/mL Ultra-LEAF purified antihuman CD16 mAb or the corresponding isotype control provided by Biolegend and washed prior to addition of IL-15-presensitized PBMCs. Cells were then incubated for 5 h. For cytotoxic assays, IL-15-pretreated PBMCs were incubated for 5 h with K562 target cells at a 1:5 ratio. For each stimulation, anti-CD107a mAb (or its corresponding IgG1 isotype control) and Golgistop (BD Biosciences) were added to cultures in the last 5 h.

Acknowledgements: We gratefully acknowledge the technical assistance of M. Charron (Etablissement Français du Sang Centre-Atlantique, Site de Poitiers, Poitiers). The authors are especially indebted to E. Schneider and J. Arsham (American translator, CHU de Poitiers) for critically reviewing the manuscript. We thank Image UP (University de Poitiers) flow cytometry core facilities. This study was supported by INSERM, CHU de Poitiers, Université de Poitiers, Ligue contre le Cancer du Grand-Ouest (Comités départementaux, de la Charente, de la Charente-Maritime, des Deux-Sèvres et de la Vienne), ARIM-PC (Association pour la Recherche en Immunologie-Poitou-Charentes), Sport & Collection, INCa -DGOS _ 8658, and Ministère de la Recherche.

Conflict of interest: The authors declare no financial or commercial conflict of interest.

References

- Lee, Y. J., Jameson, S. C. and Hogquist, K. A., Alternative memory in the CD8 T cell lineage. Trends Immunol. 2011. 32: 50–56.
- 2 Verykokakis, M., Boos, M. D., Bendelac, A. and Kee, B. L., SAP proteindependent natural killer T-like cells regulate the development of CD8(+) T cells with innate lymphocyte characteristics. *Immunity* 2010. 33: 203-215.

© 2015 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

- 3 Weinreich, M. A., Odumade, O. A., Jameson, S. C. and Hogquist, K. A., T cells expressing the transcription factor PLZF regulate the development of memory-like CD8+ T cells. Nat. Immunol. 2010. 11: 709–716.
- 4 Andreotti, A. H., Schwartzberg, P. L., Joseph, R. E. and Berg, L. J. T-Cell signaling regulated by the Tec family kinase, itk. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2010. 2: a002287. doi:10.1101/cshperspect.a002287.
- 5 Akue, A. D., Lee, J.-Y. and Jameson, S. C. Derivation and maintenance of virtual memory CD8 T cells. J. Immunol. 2012. 188: 2516–2523.
- 6 Lee, J.-Y., Hamilton, S. E., Akue, A. D., Hogquist, K. A. and Jameson, S. C., Virtual memory CD8 T cells display unique functional properties. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2013. 110: 13498–13503.
- 7 Hu, J., Sahu, N., Walsh, E. and August, A., Memory phenotype CD8+ T cells with innate function selectively develop in the absence of active Itk. Eur. J. Immunol. 2007. 37: 2892–2899.
- 8 Haluszczak, C., Akue, A. D., Hamilton, S. E., Johnson, L. D. S., Pujanauski, L., Teodorovic, L., Jameson, S. C. et al., The antigen-specific CD8+ T cell repertoire in unimmunized mice includes memory phenotype cells bearing markers of homeostatic expansion. J. Exp. Med. 2009. 206: 435-448.
- 9 Björkström, N. K., Béziat, V., Cichocki, F., Liu, L. L., Levine, J., Larsson, S., Koup, R. A. et al. CD8 T cells express randomly selected KIRs with distinct specificities compared with NK cells. Blood 2012. 120: 3455–3465.
- 10 Huard, B. and Karlsson, L., A subpopulation of GD8+ T cells specific for melanocyte differentiation antigens expresses killer inhibitory receptors (KIR) in healthy donors: evidence for a role of KIR in the control of peripheral tolerance. Eur. J. Immunol. 2000. 30: 1665–1675.
- 11 Veken, L. T. van der, Campelo, M. D., Hoorn, M. A. W. G van der, Hagedoorn, R. S., Egmond, H. M. E. van, Bergen, J. van, Willemze, R. et al., Functional analysis of killer Ig-like receptor-expressing cytomegalovirusspecific CD8+ T cells. J. Immunol. 2009. 182: 92–101. doi: 10.4049/jimmunol.182.1.92.
- 12 Fehniger, T. A., Cai, S. F., Cao, X., Bredemeyer, A. J., Presti, R. M., French, A. R. and Ley, T. J., Acquisition of murine NK cell cytotoxicity requires the translation of a pre-existing pool of granzyme B and perforin mRNAs. *Immunity* 2007. 26: 798–811.
- 13 Prlic, M., Blazar, B. R., Farrar, M. A. and Jameson, S. C., In vivo survival and homeostatic proliferation of natural killer cells. J. Exp. Med. 2003. 197: 967–976.
- 14 Ranson, T., Vosshenrich C. A. J., Corcuff, E., Richard, O., Müller, W. and Santo, J. P. D., IL-15 is an essential mediator of peripheral NK-cell homeostasis. Blood 2003. 101: 4887–4893.
- 15 Mahnke, Y. D., Brodie, T. M., Sallusto, F., Roederer, M. and Lugli, E., The who's who of T-cell differentiation: Human memory T-cell subsets. Eur. J. Immunol. 2013. 43: 2797–2809.
- 16 Warren, H. S., Rana, P. M., Rieger, D. T., Hewitt, K. A., Dahlstrom, J. E. and Kent, A. L., CD8 T cells expressing killer Ig-like receptors and NKG2A are present in cord blood and express a more naïve phenotype than their counterparts in adult blood. J. Leukoc. Biol. 2006. 79: 1252–1259.
- 17 Min, H. S., Lee, Y. J., Jeon, Y. K., Kim, E. J., Kang, B. H., Jung, K. G., Chang, C.-H. et al. MHC class II-restricted interaction between thymocytes plays an essential role in the production of innate CD8+ T cells. J. Immunol. 2011. 186: 5749–5757.
- 18 Prince, A. L., Kraus, Z., Carty, S. A., Ng, C., Yin, C. C., Jordan, M. S., Schwartzberg, P. L. et al. Development of innate CD4+ and CD8+ T cells in Itk-deficient mice is regulated by distinct pathways. J. Immunol. 2014. 193: 688–699.
- 19 Huang, W., Huang, F., Kannan, A. K., Hu, J. and August, A., ITK tunes IL-4-induced development of innate memory CD8+ T cells in a γδ T and invariant NKT cell-independent manner. J. Leukoc. Biol. 2014. 96: 55–63.

Eur. J. Immunol. 2015. 45: 1926-1933

20 Berzins, S. P., Smyth, M. J. and Baxter, A. G., Presumed guilty: natural killer T cell defects and human disease. Nat. Rev. Immunol. 2011. 11: 131– 142.

- 21 Fujii, S., Shimizu, K., Okamoto, Y., Kunii, N., Nakayama, T., Motohashi, S. and Taniguchi, M., NKT Cells as an ideal anti-tumor immunotherapeutic. Front. Immunol. 2013. 4: 409. doi: 10.3389.
- 22 Shimizu, K., Kurosawa, Y., Taniguchi, M., Steinman, R. M. and Fujii, S-i., Cross-presentation of glycolipid from tumor cells loaded with galactosylceramide leads to potent and long-lived T cell mediated immunity via dendritic cells. J. Exp. Med. 2007. 204: 2641–2653.
- 23 Tyznik, A. J., Verma, S., Wang, Q., Kronenberg, M. and Benedict, C. A., Distinct requirements for activation of NKT and NK cells during viral infection. J. Immunol. 2014. 192: 3676–3685.
- 24 Rossignol, A., Levescot, A., Jacomet, F., Robin, A., Basbous, S., Giraud, C., Roy, L. et al. Evidence for BCR-ABL-dependent dysfunctions of iNKT cells from chronic myeloid leukemia patients. *Eur. J. Immunol.* 2012. 42: 1870– 1875.

Abbreviations: CBMC: cord blood mononuclear cell · KIR: killer cell Iglike receptor · Eomes: eomesodermin · PLZF: promyelocytic leukemia zinc finger protein · T-bet: T-box transcription factor · T_{EMRA}: terminally differentiated effector memory

Full correspondence: Dr. Jean-Marc Gombert, U1082 INSERM, Pôle Biologie Santé 1, rue Georges Bonnet BP 633, 86022 Poitiers, France Fax: +33-1-49-58-33-23 e-mail: jean-marc.gombert@chu-poitiers.fr

See accompanying Commentary: http://dx.doi.org/10.1002/eji.201545761

Received: 31/1/2015 Revised: 25/3/2015 Accepted: 20/4/2015 Accepted article online: 22/4/2015

highlights 1933

© 2015 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Manuscrit 4

En préparation

Brief Report

Evidence for dysfunctions of innate CD8(+) T cells in chronic myeloid leukemia

Florence Jacomet^{1,2,3,4°}, Emilie Cayssials^{1,3,4°}, Deborah Desmier, Alice Barbarin^{1,3}, Sara Basbous^{1,4}, Anaïs Levescot¹, Aurélie Robin^{1,3}, Lucie Lefèvre¹, Christine Giraud^{1,3,5}, Anne Barra ^{2,3,4}, François Guilhot^{3,4,6}, Lydia Roy⁶, André Herbelin^{1,3,4,*} and Jean-Marc Gombert^{1,2,3,4,*}

¹INSERM 1082, Poitiers, France; ²Service d'Immunologie et Inflammation, Poitiers, France; ³CHU de Poitiers, Poitiers, France; ⁴Université de Poitiers, Poitiers, France; ⁵Etablissement Français du Sang Centre-Atlantique, Site de Poitiers, Poitiers, France; ⁶INSERM CIC-1402, Poitiers, France

[°] F.J. and E.C. contributed equally to this work.

*A.H. and J.M.G. contributed equally to this work as senior authors.

Short title: Deficiency of innate CD8(+) T cells in CML

Corresponding author: Jean-Marc Gombert

Address: U1082 INSERM, Pôle Biologie Santé; 1, rue Georges Bonnet BP 633, 86022 Poitiers; Phone: (33) 5 49 45 43 41. Email: jm.gombert@chu-poitiers.fr

Scientific Heading: myeloid neoplasia

Word counts: text (1292), abstract (200), Figures (2), References (21)

Key Points: (1) The innate CD8 T cell subset is depleted and functionally impaired in chronic phase CML patients; (2) The innate CD8 T cell subset is partially restored in patients having achieving MMR following IM therapy.

Key words: Chronic myeloid leukemia, imatinib-mesylate, innate CD8(+) T cells, iNKT cells.

Abstract

We have recently identified a new human subset of innate (KIR/NKG2A(+)) CD8 T cells which express high Eomesodermin (Eomes) levels, are endowed with cytotoxic activity and promptly produce IFN- \Box after exposure to pro-inflammatory cytokines. These features support a potential role in cancer immune surveillance analogous to invariant natural killer T (iNKT) cells, which are functionally deficient in patients suffering from chronic myeloid leukemia (CML). In accordance with a possible regulatory function during tumorigenesis, we found that the pool of blood innate CD8(+) T cells was severely reduced in CML patients at diagnosis. Moreover, like iNKT and NK cells, innate CD8(+) T cells were functionally impaired, as attested by their loss of antigen-independent cytotoxic activity and IFN- γ production in response to innate-like stimulation with IL-12+IL-18. Remarkably, both innate CD8(+) T cells and iNKT cells returned to normal after complete CML remission upon Imatinib-mesylate (IM) therapy. This finding is consistent with a promyelocytic leukemia zinc finger/iNKT cell-dependent generation of circulating innate CD8(+) T cells, similarly to the observations in mice. Our study provides a better understanding of the T cell components restored upon IM therapy and reveals a possible contribution of the iNKT/innate CD8(+) T cell axis to tumor surveillance in CML.
Introduction

Chronic myeloid leukemia (CML) is a well-characterized myeloproliferative disorder, which results from dysregulated tyrosine kinase (TK) activity of the fusion oncoprotein BCR-ABL¹. Imatinibmesylate (IM), a competitive inhibitor of the BCR-ABL TK activity, is currently used as a first-line therapy for newly diagnosed patients in the chronic phase (CML-CP)². However, persistence of a residual disease generally requires long-term treatment associated with a number of side effects³. For this reason, additional therapeutic strategies aiming at a potentiation and/or restoration of immune anti-tumor functions remain a main avenue of research for long-term control of CML.

Several clinical and experimental data support the contribution of innate immune components, to CML remission. These regulatory elements comprise dendritic cells⁴, NK cells^{5,6} and invariant natural killer T (iNKT) cells⁷, an innate T cell subset co-expressing activated/memory and NK markers, which is well recognized for its antitumor activity⁸⁻¹¹. In accordance with this notion, we have recently reported functional iNKT cell deficiencies in CML-CP patients⁷, such as reduced or suppressed expression of perforin, CD95L and promyelocytic leukemia zinc finger (PLZF), a transcription factor required for maintenance of iNKT cell functions^{12,13}. Furthermore, these functional deficiencies were repaired in patients having achieved complete cytogenetic remission (CCgR) following TKI or IFN- α therapy⁷.

More recently, we have identified in healthy donors (HD), a distinct new CD8 T cell subset exhibiting a marked innate (KIR/NKG2A(+)) and memory (CD45RA(+)CCR7(-)CD57(+)) phenotype with high Eomesodermin (Eomes) expression^{14,15}. These cells share functional and phenotypic features with innate T CD8(+) cells in mice¹⁶⁻¹⁹, such as cytotoxic activity and rapid IFN- γ production after exposure to pro-inflammatory cytokines. Knowing that the generation of innate T CD8(+) cells in mice depends on PLZF-expressing NKT cells^{20,21} and considering the functional deficiencies of iNKT cells in CML patients at diagnosis, we surmised that the KIR/NKG2A(+)Eomes(+)CD8(+) T cell compartment, that we termed innate T CD8(+) cells, might also be altered during CML. In the present study we addressed this issue together with the question whether their normal functions were restored after CCgR.

Methods

Venous blood from CML-CP patients at diagnosis or having achieved CCgR and currently treated with IM (CML-IM) was collected on heparin (Oncology-Hematology Department, Poitiers, France). All patients gave informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki for participation in the study, which was approved by the scientific committee of the Inserm CIC-1402 (Poitiers, France). HD were volunteers from the Pôle Biologie Santé (Poitiers, France). Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from blood samples by density gradient centrifugation (Histopaque[®]-1077, Sigma-Aldrich), resuspended in 90% fetal calf serum with 10% DMSO, and placed in a controlled rate freezer for cryopreservation at -80°c until use. Additional methods are available in the supplemental material.

Results and Discussion

Quantitative and functional deficiencies of innate CD8(+) T cells from CML-CP patients

CD8(+) T cells co-expressing Eomes and KIR/NKG2A represent a new, functionally distinct "innate" subset in humans, with potential anti-tumor activities^{14,15}. Based on our evidence for CML immune subversion of iNKT-cell activities⁷, we first investigated possible dysfunctions of this new CD8 T subset at diagnosis. As depicted in **Figure 1A (for gating strategy, see Figure S1)**, the frequency of KIR/NKG2A(+)Eomes(+)CD8(+) T cells was 3.5-fold lower in CML-CP patients than in HD. Note that both the proportion of cells expressing Eomes among the KIR/NKG2A(+) CD8 T cell subset and the expression levels were significantly reduced, as compared to HD (**Figure 1A, left and right panel, respectively and Figure S2**). Taken together, these data are consistent with an impaired differentiation of the innate CD8 T cell subset in CML-CP patients.

We have previously reported¹⁴ and confirm in our present HD cohort (**Figure 1B**) that the rapid production of IFN- γ in response to innate-like stimulation by IL-12+IL-18 constitutes a unique hallmark of innate CD8(+) T cells. Remarkably, this function was not maintained in their counterpart from CML-CP patients in which IL-12+IL-18-induced intracellular IFN- γ expression was virtually undetectable (<1% IFN- γ +) cells), as compared to HD (~25% IFN- γ +) cells) (**Figure 1B**). In HD, innate CD8(+) T cells are endowed with higher cytolytic activity than their conventional/memory (KIR/NKG2A(-)Eomes(+)) CD8(+) counterpart, as assessed by their higher perforin expression (**Figure 1C**), and natural antibody-dependent cytotoxicity through human CD16 as a lysis receptor (**Figure 1D**). Once again, as for IFN- γ production, these two functions were dramatically reduced in innate CD8(+) T cells from CML-CP patients, down to levels found in the conventional/memory population (**Figure 1C&1D**). Finally, the pool of classical NK cells displayed likewise a decreased cytolytic activity in CML-CP patients (**Figure S3**). These data, along with the similar frequencies of IFN- γ -expressing innate CD8(+) T cells upon TCR engagement in HD and CML-CP patients (**Figure S4**), imply that the functional deficiencies of innate CD8(+) T cells in CML patients are relevant to innate rather than adaptive immune responses.

Correction of both quantitative and functional deficiencies of innate CD8(+) T cells in patients with CCgR

In patients having achieved CCgR following IM therapy, referred to as CML-IM patients, we observed a recovery of innate CD8(+) T cells (**Figure 2A, left panel**), back to proportions occurring in HD. Accordingly, Eomes expression in innate CD8(+) T cells (**Figure 2A, right panel**) as well as the proportion of cells expressing Eomes among KIR/NKG2A(+) CD8(+) T cells (**Figure S2**) returned to normal in CML-IM patients. Importantly, cell functions were likewise partially restored in these conditions, namely IFN- γ expression in response to IL-12+IL-18 (**Figure 2B**) as well as cytolytic activity (**Figure 2C**). Overall, the partial reversal of the innate CD8 T-cell defect by IM therapy points to a possible contribution of this subset to disease control. It remains to be established whether it contributes to the efficiency of the therapeutic response and/or the maintenance of remission after treatment discontinuation.

Knowing that the differentiation of innate-memory CD8(+) T cells in mice mostly depends on PLZF-expressing NKT cells *via* their IL-4 production^{20,21}, we further investigated the possible involvement of iNKT cells as a key player in the generation of innate CD8(+) T cells during CML. In agreement with this hypothesis, we found a significant positive correlation between the levels of Eomes in KIR/NKG2A(+)CD8(+) T cells and of PLZF in iNKT cells including all HD, CML-CP and CML-IM samples available (**Figure 2D**).

We have previously reported that IL-4 production by iNKT cell returned to normal or exceeded normal in patients having achieved complete CML remission with TKI or IFN- \Box therapy, respectively⁷. If the recent evidence in mice, which shows that IL-4 and IFN- \Box promote the generation/differentiation of innate CD8(+) T cells²⁰⁻²² were applicable in humans, we would expect a direct impact of iNKT cell subsets on innate CD8(+) T cells in our cohorts, in terms of both cell counts and functional potential. The rationale for therapeutic strategies against CML combining TKI with

immune-based therapies, especially those targeting iNKT cells, such as $IFN-\Box^7$ would thus gain further support.

From a more general point of view, the validation of this new innate immune axis and its contribution to tumor control in CML patients reaching remission in response to TKI, would provide a means of predicting the disease outcome and circumventing the consequences of treatment discontinuation.

Acknowledgments

We gratefully acknowledge the technical assistance of M. Charron (Etablissement Français du Sang Centre-Atlantique, Site de Poitiers, Poitiers). The authors are especially indebted to E. Schneider for critically reviewing the manuscript of which the English was reviewed by Jeffrey Arsham, an American medical translator. We thank Image UP (Université de Poitiers) flow cytometry core facilities. This study was supported by INSERM, CHU de Poitiers, Université de Poitiers, Ligue contre le Cancer du Grand Ouest (Comités départementaux de la Vienne, de la Charente, de la Charente Maritime et des Deux-Sèvres), Association pour la Recherche en Immunologie-Poitou-Charentes (ARIM-PC), Ministère de la Recherche, Sport & Collection, and INCa-DGOS 8658 (PRT-K 2015-052).

Authorship and disclosure

F.J. and E.C. designed the experiments, did the experiments, analyzed and interpreted the data, and wrote the manuscript. D.D., A.B., A.L, and S.B. designed the experiments, did the experiments, analyzed and interpreted the data. A.R. and L.L. provided assistance with cell cultures. C.G. contributed to PBMCs preparation from patients and healthy controls. A.B. designed the experiments. *F.G and L.R. provided clinical samples and contributed to the interpretation of data. A.H. and JM.G. together were responsible for the overall study design, supervised the project and took primary responsibility for writing the manuscript. The authors have no conflicting financial interests.*



Figure 1: CML-CP is associated with acquired quantitative and functional defects of innate CD8(+) T cells. (A) Decreased innate CD8(+) T cell counts in CML-CP patients. PBMCs were membrane-labeled with anti-CD3-BV421, anti-CD8-PECy7, and anti-pan-KIR/NKG2A-PE, fixed, permeabilized, and stained with anti-Eomes-AF647. Quantile contour plots show one representative sample for each group of HD or CML-CP patients. Each dot represents one HD or CML-CP patient. Left panel: Frequency of KIR/NKG2A(+)Eomes(+)CD8(+) T cells in HD and CML-CP patients. Expression of Eomes and KIR/NKG2A was analyzed after gating on total CD8(+)CD3(+) cells. Data show frequencies (means \pm SEM) of KIR/NKG2A(+)Eomes(+) cells among CD8(+)CD3(+) cells in HD $(7.2\% \pm 1.4; n=9)$ and CML-CP patients $(1.9\% \pm 0.7; n=6)$. Right panel: Eomes expression levels in KIR/NKG2A(+)CD8(+) T cells from HD and CML-CP patients were analyzed after gating on KIR/NKG2A(+)CD3(+)CD3(+) cells. Data (means \pm SEM) are expressed as relative Mean Fluorescence Intensity (MFI) of Eomes expression (calculated by dividing MFI in KIR/NKG2A(+)CD8(+)CD3(+) cells by MFI from total KIR/NKG2A(-)CD3(-) cells) in HD ($3.95 \pm$ 0.52; n=15) and CML-CP patients (2.34 \pm 0.32; n=6). (B) Defective IFN-y expression by innate CD8(+) T cells from CML-CP patients in response to innate-like stimulation by IL-12+IL-18. PBMCs were cultured for 48 hours with IL-12+IL-18 (20 ng/mL together, R&D Systems). PBMCs were then membrane-labeled with anti-CD3-BV421, anti-CD8-PECy7, and anti-pan-KIR/NKG2A-PE, fixed, permeabilized, and stained with anti-Eomes-AF64 and anti-IFN-y-FITC. IFN-y expression was analyzed after gating on panKIR/NKG2A(+)Eomes(+)CD3(+) CD3(+) cells and panKIR/NKG2A(-)Eomes(+)CD8(+)CD3(+) cells. Histograms represent frequencies (means \pm SEM) of IFN- γ expressing cells after IL-12+IL-18 stimulation among KIR/NKG2A(+)Eomes(+)CD8(+) T cells or KIR/NKG2A(-)Eomes(+)CD8(+) T cells from HD (24.8% \pm 1.2; n=6, and 1.4% \pm 0.8; n=6, respectively) and CML-CP patients $(0.7\% \pm 0.1; n=6, and 0.4\% \pm 0.02; n=5, respectively)$. Full cohort data are shown. Without stimulation, frequency of IFN- γ expressing cells was lower than 0.1%. (C) Defective perforin expression in innate CD8(+) T cells from CML-CP patients. Perforin expression in KIR/NKG2A(+)Eomes(+)CD8(+)CD3(+) cells and KIR/NKG2A(-)Eomes(+)CD8(+)CD3(+) cells was analyzed among PBMCs by flow cytometry ex vivo. PBMCs were membrane-labeled with anti-CD3-BV421, anti-CD8-PECy7, and anti-pan-KIR/NKG2A-PE, fixed, permeabilized, and stained with anti-Eomes-AF647 and anti-perforin-FITC. Data (means \pm SEM) are expressed as relative MFI of perforin expression (calculated by dividing MFI in KIR/NKG2A(+)Eomes(+)CD8(+)CD3(+) cells or KIR/NKG2A(-)Eomes(+)CD8(+)CD3(+) cells by MFI from total KIR/NKG2A(-)CD3(-) cells) in HD $(5.3 \pm 1.2; n=7, and 3.3 \pm 1.1; n=7, respectively)$ and CML-CP patients $(2.6 \pm 0.4; n=7, and 2.1 \pm 0.4;$ n=7, respectively). (D) Defective natural cytotoxic activity in innate CD8(+) T cells from CML-CP patients. PBMCs were preincubated for 48 hours with IL-15 (20 ng/mL, R&D Systems) prior to CD16 triggering, and cytotoxicity in the form of CD107a degranulation/expression was evaluated by flow cvtometry¹². Data (means \pm SEM) are expressed as frequencies of CD107a-expressing cells in KIR/NKG2A(+) and KIR/NKG2A(-) Eomes(+)CD8(+)CD3(+) cell populations from HD (26.4% \pm 6.2; n = 6 and 11.4% \pm 3.5; n = 6, respectively) and CML-CP patients (6.8% \pm 4.1; n = 5, and 5.1% \pm 1.9; n = 5, respectively). (A-D) Statistical significance was determined by the Mann Whitney non-parametric test. *p<0.05; **p<0.01.



Figure 2

Figure 2: The innate CD8(+) T cell defect is partially reversed by IM therapy: possible implication of iNKT cells. (A) Restoration of the pool of innate CD8(+) T cells in CML-IM patients. PBMCs were membrane-labeled with anti-CD3-BV421, anti-CD8-PECy7, and anti-pan-KIR/NKG2A-PE, fixed, permeabilized, and stained with anti-Eomes-AF647. Left panel: Frequency of KIR/NKG2A(+)Eomes(+)CD8(+) T cells in CML-CP and CML-IM patients. Expression of Eomes and KIR/NKG2A was analyzed after gating on total CD8(+)CD3(+) cells. Histograms show frequency

(mean \pm SEM) of KIR/NKG2A(+)Eomes(+) cells among CD8(+)CD3(+) cells in CML-CP (2.2% \pm 0.7; n=7) and CML-IM (5.0% \pm 1.0; n=13) patients. Dotted lines represent mean frequency values in HD (8.1%± 1.3; n=10). Right panel: Eomes expression level in KIR/NKG2A(+)CD8(+) T cells from CML-CP and CML-IM patients was analyzed after gating on KIR/NKG2A(+)CD8(+)CD3(+) cells. Data (means \pm SEM) are expressed as relative MFI of Eomes expression (calculated by dividing MFI in KIR/NKG2A(+)CD3(+)CD3(+) cells by MFI from total KIR/NKG2A(-)CD3(-) cells) in CML-CP $(2.3 \pm 0.3; n=7)$ and CML-IM patients $(4.1 \pm 0.7; n=7)$. Dotted lines represent mean relative Eomes MFI values in HD (3.9 \pm 0.5; n=15). (B) Partial restoration of IL-12+IL-18-induced IFN-y expression by innate CD8(+) T cells from CML-IM patients. For details, see legend of Figure 1B. Histograms represent frequencies (means \pm SEM) of IFN- γ -expressing cells after IL-12+IL-18 stimulation in CML-CP (0.7% \pm 0.1; n=5) and CML-IM patients (7.7% \pm 2.3; n=6). Without stimulation, frequency of IFN- γ expressing cells was lower than 0.1%. Dotted lines represent mean frequency values in HD (24.8% \pm 1.2; n=6). (C) Restoration of cytolytic activity in innate CD8(+) T cells from CML-IM patients. CD107a degranulation/expression after CD16 triggering (for details, see legend of Figure 1D) in KIR/NKG2A(+)Eomes(+)CD8(+)CD3(+) cells was analyzed by flow cytometry among PBMCs preincubated for 48 hours with IL-15. Data (means \pm SEM) are expressed as frequencies of CD107a-expressing cells in KIR/NKG2A(+)Eomes(+)CD3(+)CD3(+) cells from CML-CP (6.8% \pm 4.1; n= 5) and CML-IM patients (27.3% \pm 8.3; n = 6). Dotted lines represent mean frequency values in HD ($26.4\% \pm 6.2$; n=6). (D) Positive correlation between iNKT cell PLZF *expression and innate CD8⁺ T cell Eomes expression.* Eomes and PLZF expression were analyzed in innate-like CD8(+) T cells and iNKT cells, respectively, among PBMCs by flow cytometry ex vivo after cellular permeabilization. For analysis of Eomes in innate-like CD8(+) T cells, PBMCs were membrane-labeled with anti-CD3-BV421, anti-CD8-PECy7, and anti-pan-KIR/NKG2A-PE, fixed and permeabilized, and then stained with anti-Eomes-AF647. For analysis of PLZF in iNKT cells, PBMC were membrane-labeled with anti-CD3-BV421, anti-iNKT 6B11-APC, fixed and permeabilized, and then stained with anti-PLZF-PE. Expression of Eomes and PLZF were analyzed after gating on panKIR/NKG2A(+)CD8(+)CD3(+) cells and 6B11(+)CD3(+) cells, respectively. MFI values are expressed relative to that of isotype control. Data from HD (n=6), CML-CP (n=6) and CML-IM (n=3) were pooled. The MFI of PLZF-expressing iNKT (6B11(+)CD3(+)) cells correlate positively with MFI of Eomes expression on innate CD8(+) T (KIR/NKG2A(+)CD8(+)CD3(+)) cells (correlation Spearman test; n=14, r=0.7275, p=0.0043). (A-D) Statistical significance was determined by the Mann Whitney non-parametric test. *p<0.05; **p<0.01.

References

1. Goldman JM, Melo JV. Chronic myeloid leukemia advances in biology and new approaches to treatment. N. Engl. J. Med. 2003;349(15):1451–1464.

2. Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, et al. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. N. Engl. J. Med. 2006;355(23):2408–2417.

3. Deininger MWN. Optimizing therapy of chronic myeloid leukemia. Exp. Hematol. 2007;35(4, Supplement):144–154.

4. Dong R, Cwynarski K, Entwistle A, et al. Dendritic cells from CML patients have altered actin organization, reduced antigen processing, and impaired migration. Blood. 2003;101(9):3560–3567.

5. Chen CI-U, Koschmieder S, Kerstiens L, et al. NK cells are dysfunctional in human chronic myelogenous leukemia before and on imatinib treatment and in BCR–ABL-positive mice. Leukemia. 2012;26(3):465–474.

6. Chiorean EG, Dylla SJ, Olsen K, et al. BCR/ABL alters the function of NK cells and the acquisition of killer immunoglobulin-like receptors (KIRs). Blood. 2003;101(9):3527–3533.

7. Rossignol A, Levescot A, Jacomet F, et al. Evidence for BCR-ABL-dependent dysfunctions of iNKT cells from chronic myeloid leukemia patients. Eur. J. Immunol. 2012;42(7):1870–1875.

8. Berzins SP, Smyth MJ, Baxter AG. Presumed guilty: natural killer T cell defects and human disease. Nat. Rev. Immunol. 2011;11(2):131–142.

9. Fujii S-I, Shimizu K, Okamoto Y, et al. NKT cells as an ideal anti-tumor immunotherapeutic. Front. Immunol. 2013;4:409.

10. Matsuda JL, Mallevaey T, Scott-Browne J, Gapin L. CD1d-restricted iNKT cells, the "Swiss-Army knife" of the immune system. Curr. Opin. Immunol. 2008;20(3):358–368.

11. Macho-Fernandez E, Brigl M. The Extended Family of CD1d-Restricted NKT Cells: Sifting through a Mixed Bag of TCRs, Antigens, and Functions. Front. Immunol. 2015;6:.

12. Savage AK, Constantinides MG, Han J, et al. The Transcription Factor PLZF Directs the Effector Program of the NKT Cell Lineage. Immunity. 2008;29(3):391–403.

13. Kovalovsky D, Uche OU, Eladad S, et al. The BTB-zinc finger transcriptional regulator, PLZF, controls the development of iNKT cell effector functions. Nat. Immunol. 2008;9(9):1055–1064.

14. Jacomet F, Cayssials E, Basbous S, et al. Evidence for eomesodermin-expressing innate-like CD8(+) KIR/NKG2A(+) T cells in human adults and cord blood samples. Eur. J. Immunol. 2015;45(7):1926–1933.

15. Van Kaer L. Innate and virtual memory T cells in man. Eur. J. Immunol. 2015;45(7):1916–1920.

16. Lee YJ, Jameson SC, Hogquist KA. Alternative memory in the CD8 T cell lineage. Trends Immunol. 2011;32(2):50–56.

17. Andreotti AH, Schwartzberg PL, Joseph RE, Berg LJ. T-Cell Signaling Regulated by the Tec Family Kinase, Itk. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2010;2(7):a002287.

18. Akue AD, Lee J-Y, Jameson SC. Derivation and Maintenance of Virtual Memory CD8 T Cells. J. Immunol. 2012;188(6):2516–2523.

19. Lee J-Y, Hamilton SE, Akue AD, Hogquist KA, Jameson SC. Virtual memory CD8 T cells display unique functional properties. Proc. Natl. Acad. Sci. 2013;110(33):13498–13503.

20. Verykokakis M, Boos MD, Bendelac A, Kee BL. SAP protein-dependent natural killer T-like cells regulate the development of CD8(+) T cells with innate lymphocyte characteristics. Immunity. 2010;33(2):203–215.

21. Weinreich MA, Odumade OA, Jameson SC, Hogquist KA. T cells expressing the transcription factor PLZF regulate the development of memory-like CD8+ T cells. Nat. Immunol. 2010;11(8):709–716.

22. Martinet V, Tonon S, Torres D, et al. Type I interferons regulate eomesodermin expression and the development of unconventional memory CD8(+) T cells. Nat. Commun. 2015;6:7089.

Supplemental Methods

Phenotypic analysis of PBMCs was performed by flow cytometry either ex vivo or after culture as previously reported¹². Expression of different markers was assessed by staining with appropriate combinations of mAb conjugated directly to fluorochromes and directed against CD3, CD8, KIR2D+KIR3DL1/KIR3DL2 (CD158e/k) and NKG2A (CD159a), referred to as pan-KIR/NKG2A, IFN-y, perforin, iNKT 6B11 clonotype (all from Biolegend), Eomes and PLZF (from eBioscience). Dead cells were excluded by using the Live/Dead® Fixable NearIR Dead Cell Stain kit (Life Technologies). For nuclear Eomes or PLZF staining and intracytoplasmic IFN- or perform staining, cells were permeabilized with an anti-human Foxp3 staining kit (eBioscience) and a Cytofix/Cytoperm kit (BD Biosciences), respectively. IFN-y and CD107a degranulation assays were performed as previously described¹². Cells were analyzed by eight-color flow cytometry (FACSVerseTM cyometer and FACSuiteTM software, BD Biosciences), and data were reanalyzed with FlowJoTM (Treestar). All cell cultures (1×10⁶ cells/mL) were performed in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heatinactivated FCS and antibiotics. For IFN-y and CD107a degranulation assays, cells were seeded into 24-well plates or 96-well round (U) bottom culture plates, respectively, and Golgistop (BD Biosciences) was added in the last 4 hours of culture. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 6.0 (GraphPad Software).

Supplemental Figures



Supplemental Figure 1

Supplemental Figure 1. Gating Strategy. Eomes and KIR/NKG2A expression among PBMCs were analyzed by flow cytometry after gating on CD8(+)CD3(+) cells among live (NearIR(low)) cells. One representative sample is shown for each group. Eomes and KIR/NKG2A expression: gray solid lines; isotype control: gray dotted lines. Numbers indicate the frequencies of cells of interest among CD8(+)CD3(+) cells.

Supplemental Figure 2



Supplemental Figure 2. Frequency of Eomes-expressing cells among KIR/NKG2A(+) CD8(+) T cells from HD, CML-CP and CML-IM patients. Eomes expression was analyzed after gating on KIR/NKG2A(+)CD8(+)CD3(+) cells. PBMCs were membrane-labeled with anti-CD3-BV421, anti-CD8-PECy7, and anti-pan-KIR/NKG2A-PE, fixed and permeabilized, and then stained with anti-Eomes-AF647. Histogram overlays show one representative sample for each group of HD, CML or CML-IM patients. Full cohort data: histograms show frequency of Eomes(+) cells among KIR/NKG2A(+)CD8(+) T cells in HD (46.5% \pm 4.6; n=14), CML-CP (26.3% \pm 3.2; n=6) and CML-IM (42.7% \pm 2.9; n= 6) patients. Statistical significance was determined by the Mann Whitney non-parametric test. *p<0.05; **p<0.01.

Supplemental Figure 3



Supplemental Figure 3. IFN-D expression in response to innate-like stimulation and natural cytolitic activity of NK cells from CML-CP patients are impaired. (A) Defective IFN-y expression by KIR/NKG2A(+)CD3(-) cells from CML-CP patients in response to innate-like stimulation by IL-12+IL-18. PBMCs were cultured for 48 hours with IL-12+IL-18 (20 ng/mL together, R&D Systems). PBMCs were then membrane-labeled with anti- BV421, anti-CD8-PECy7, and anti-pan-KIR/NKG2A-PE, fixed, permeabilized, and stained with anti-Eomes-AF64 and anti-IFN- γ -FITC. IFN- γ expression was analyzed after gating on panKIR/NKG2A(+)CD3(-) cells. Histograms represent frequencies (means \pm SEM) of IFN- γ -expressing cells after IL-12+IL-18 stimulation among KIR/NKG2A(+)CD3(-) cells from HD ($25.8\% \pm 3.9$; n=15) and CML-CP patients ($7.0\% \pm 2.0$; n=8). Full cohort data are shown. (B) Defective natural cytotoxic activity in KIR/NKG2A(+)CD3(-) cells from CML-CP patients. PBMCs were preincubated for 48 hours with IL-15 (20 ng/mL, R&D Systems) prior to CD16 triggering, and cytotoxicity in the form of CD107a degranulation/expression was evaluated by flow cytometry. Data (means \pm SEM) are expressed as frequencies of CD107aexpressing cells in KIR/NKG2A(+)CD3(-) cell populations from HD ($65.9\% \pm 8.1$; n = 6) and CML-CP patients $(34.3\% \pm 11.5; n = 5)$ Full cohort data are shown. Statistical significance determined by the Mann Whitney non-parametric test. **p<0.01, *p<0.05.

Supplemental Figure 4



Supplemental Figure 4. IFN- γ expression by innate T cells from HD and CML-CP patients in response to TCR engagement. PBMCs were cultured for 16 hours with anti-CD3/CD28 beads (Dynabeads[®] Human T-activator CD3/CD28, Invitrogen). PBMCs were then membrane-labeled with anti-CD3-BV421, anti-CD8-PECy7, and anti-pan-KIR/NKG2A-PE, fixed and permeabilized, and then stained with anti-Eomes-AF64 and anti-IFN- γ -FITC. IFN- γ expression was analyzed after gating on panKIR/NKG2A(+)Eomes(+)CD8(+)CD3(+) cells. Histograms represent frequency (mean ± SEM) of IFN- γ -expressing cells after TCR stimulation in HD (7.8% ± 6.4; n=7) and CML-CP patients (9.1% ± 2.3; n=7). Full cohort data are shown.

Discussion générale et perspectives

I- Anergie des cellules iNKT : un mécanisme mettant en jeu un déficit d'expression membranaire de CD1d sur les DC myéloïdes

En se basant sur l'ensemble des résultats des expériences de modélisation animale évoqués dans la première et la deuxième partie de l'introduction générale, les cellules iNKT semblent jouer un rôle clé dans l'immunosurveillance et l'immunoédition des cancers. En accord avec cette hypothèse, plusieurs équipes ont montré chez l'homme des anomalies des fonctions des cellules iNKT dans de nombreux cancers solides (Giaccone et al., 2002) tels que ceux de la prostate (Tahir et al., 2001) ou des poumons (Ishikawa et al., 2005) mais aussi chez des patients présentant des hémopathies malignes comme le myélome (Dhodapkar et al., 2003). Dans le présent travail, nous avons recherché l'existence d'une immunoédition au cours de la LMC associée à une altération numérique et/ou fonctionnelle des cellules iNKT.

Peu de travaux s'étaient jusqu'ici intéressés à la population iNKT au cours de la LMC. Dans une étude de 2004, Yoneda et coll. avaient analysé le nombre absolu et la fréquence des cellules iNKT dans une cohorte contenant seulement 2 patients au diagnostic et 8 patients traités en rémission (Yoneda et al., 2005). Une autre étude montrait que les cellules iNKT provenant de patients en rémission cytogénétique complète après traitement avec IM étaient capables de produire l'IFN- γ tandis que celles provenant des patients ayant seulement une réponse cytogénétique partielle ne le produisaient pas (Shimizu et al., 2006).

Nos résultats décrivent une altération fonctionnelle profonde des cellules iNKT provenant des patients LMC-PC. Les cellules iNKT de ces patients ne prolifèrent pas en réponse à leur ligand α -GalCer par comparaison aux cellules provenant de sujets sains. Les niveaux d'expression de la perforine et de CD95L sont fortement diminués. Cet état d'anergie est bien associé à l'oncogène BCR-ABL. En effet, ces défauts sont corrigés chez les patients en rémission cytogénétique complète après traitement avec l'IM ou l'IFN- α . Ces résultats suggèrent que l'oncogène BCR-ABL est impliqué dans la dérégulation des fonctions des cellules iNKT en agissant soit directement (origine intrinsèque) soit indirectement (origine extrinsèque) sur ces cellules.

1. <u>L'anergie des cellules iNKT des patients LMC-PC résulte d'un défaut</u> <u>cellulaire extrinsèque</u>

Les cellules iNKT des patients n'expriment pas BCR-ABL et n'ont donc pas d'activité tyrosine kinase dérégulée (**Manuscrit 1**). Cela nous a conduits à rechercher une cause extrinsèque responsable de l'anergie de ces cellules. Sachant que les DC myéloïdes des patients LMC-PC expriment BCR-ABL, nous avons donc recherché si l'état d'anergie des cellules iNKT pouvait être dépendant d'un défaut de présentation résultant d'une anomalie des DC myéloïdes. Cette hypothèse a été vérifiée par des expériences utilisant des co-cultures de DC (obtenues *in vitro* à partir des monocytes différenciés en DC et dénommés Mo-DC) et de lignées iNKT provenant de sujets sains. De cette manière, nous avons pu montrer que les DC myéloïdes des patients LMC-PC, lorsqu'elles sont chargées avec le ligand α -GalCer, ont bien une capacité diminuée à activer ces lignées iNKT (**Manuscrit 1**). Or ce mode de stimulation du TCR des cellules iNKT nécessite une présentation du ligand glycolipidique par la molécule CD1d des DC myéloïdes.

2. <u>Les DC myéloïdes des patients LMC-PC ont une expression</u> membranaire de CD1d diminuée

Il est déjà décrit dans plusieurs types de cancers solides que les cellules tumorales diminuent l'expression de CD1d à leur surface pour échapper au contrôle du système immunitaire (Hix et al., 2011; Spanoudakis et al., 2009). De plus, il a été montré chez les patients atteints de leucémie lymphoïde chronique une diminution de l'expression de CD1d sur les lymphocytes B portant l'oncogène responsable de la maladie (Guo et al., 2014; Weinkove et al., 2013). S'agissant de la phase chronique de la LMC, nous montrons une diminution de l'expression membranaire de CD1d sur les DC myéloïdes circulantes, lesquelles sont présumées exprimer l'oncogène responsable de la maladie. De manière intéressante, ce défaut d'expression de CD1d semble bien résulter de cette expression intrinsèque de l'oncogène BCR-ABL. En effet, nous n'avons pas retrouvé de modification de l'expression de CD1d parmi les lymphocytes B, lesquels n'expriment pas BCR-ABL. On retiendra aussi qu'il y a normalisation de l'expression membranaire de CD1d par les DC myéloïdes circulantes chez les patients en rémission cytogénétique complète (Figure 20). Ce résultat constitue un second argument fort en faveur d'un lien entre l'expression de l'oncogène BCR-ABL par les DC myéloïdes circulantes et leur expression membranaire diminuée de CD1d.



Figure 20 : Restauration du pourcentage des cellules exprimant CD1d parmi les DC myéloïdes circulantes des patients ayant obtenu une réponse cytogénétique complète après traitement par IM. Les cellules CD1d positive parmi les DC myéloïdes ont été analysées *ex vivo* par cytométrie en flux au sein des cellules mononucléées de donneurs sains (DS, n=20), de patients atteints de LMC en phase chronique au diagnostic (LMC-PC, n=23) ou en rémission cytogénétique complète après traitement par IM (n=6). L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du test non paramétrique de Mann Whitney.

Cette baisse significative du niveau d'expression de CD1d membranaire observée *ex-vivo* a été confirmée tant par cytométrie en flux que par microscopie confocale dans notre modèle *in vitro* de différenciation en Mo-DC provenant de monocytes de patients LMC-PC par comparaison à celle des donneurs sains (**Manuscrit 2**). De plus, nous avons vérifié par hybridation *in situ* la présence de BCR-ABL dans les Mo-DC des patients LMC-PC.

3. <u>La diminution d'expression membranaire de CD1d résulte-t-elle d'un</u> <u>défaut de synthèse, de maturation de cette molécule ou d'un</u> <u>phénomène de rétention dans les lysosomes ?</u>

Le défaut n'est pas associé à une dérégulation de la synthèse du transcrit de CD1d. En effet, nous avons montré que le niveau d'expression du transcrit CD1d dans les Mo-DC est comparable à celui des donneurs sains. Il n'est pas non plus associé à un défaut de maturation des DC comme l'atteste leur expression de HLA-DR et de CD86 qui est comparable à celle des DC des sujets sains. Ceci a été montré dans les DC des patients tant *ex vivo* qu'après différenciation *in vitro*. Une forte expression de CD1d au niveau intracytoplasmique dans les cellules Mo-DC des patients LMC-PC a été retrouvée, laquelle colocalise avec le marqueur des lysosomes LAMP-1 (Figure 21). Ce dernier résultat permet de proposer que la diminution

de l'expression membranaire de CD1d est due en partie à une rétention de cette molécule dans les lysosomes. Ce résultat est conciliable avec l'hypothèse d'un défaut d'apprêtement de CD1d qui sera discuté dans le paragraphe 1.6. de cette discussion générale.



Figure 21 : La diminution de l'expression membranaire de CD1d est due en partie à une rétention de cette molécule dans les lysosomes. Des monocytes CD14 purifiés à partir des cellules mononucléées de patients ou de donneurs sains (DS) ont été différenciés en Mo-DC après 72h de culture en présence d'IL-4 et de GM-CSF puis une étape de maturation finale en présence de LPS. Ces cellules ont été marquées avec un anti-CD1d (rouge) et un anti-LAMP-1 (vert) et analysées par microscopie confocale.

4. <u>Le défaut d'expression membranaire de CD1d dépend en partie de</u> l'activation de la voie Rho/ROCK

Le traitement des Mo-DC des patients LMC-PC avec l'IM ne restaure pas l'expression membranaire de CD1d suggérant que le mécanisme dépendant de BCR-ABL et conduisant à un défaut d'expression de CD1d par les DC n'est pas dû à l'activité tyrosine kinase dérégulée (**Manuscrit 2**). Or la protéine BCR-ABL dérégule des voies de signalisation qui ne sont pas toutes sous le contrôle de l'activité tyrosine kinase constitutive de l'oncoprotéine BCR-ABL. En particulier, on soulignera que le domaine DH-PH, qui porte l'activité catalytique d'échange GTP-GDP présent dans la partie BCR de BCR-ABL, augmente le recrutement des petites protéines G de la famille Rho, aboutissant à une augmentation de l'activation de la voie ROCK. Or il a été montré que l'activation de cette voie entraîne une diminution de

présentation d'antigène par CD1d *via* son action sur le cytosquelette d'actine, ceci en inhibant leur apprêtement (Gallo et al., 2012). En effet, la voie Rho/ROCK empêche la dégradation intracellulaire d'antigène α -GalGalCer portant un motif disaccharide nécessitant d'être coupé avant de stimuler les cellules iNKT (Gallo et al., 2012).

Prenant appui sur ces données de la littérature et sur nos données expérimentales, notre hypothèse était que l'expression de BCR-ABL par les DC, en augmentant le recrutement des petites protéines G de la famille Rho, diminue l'expression de CD1d par ces cellules et aboutit à un défaut de présentation. En accord avec cette hypothèse, nous avons montré que le traitement par Y27632, un inhibiteur de la voie ROCK, entraîne une augmentation significative de l'expression de CD1d membranaire des Mo-DC provenant des patients alors que cette expression ne varie pas dans les Mo-DC des donneurs sains. D'une manière intéressante, alors que l'IM n'a pas d'effet par lui-même, son ajout à Y-27632 entraîne une augmentation significative de l'expression de CD1d par comparaison à la condition avec Y-27632 seul, suggérant l'existence d'une synergie entre les deux inhibiteurs. En lien avec ce résultat, une étude de 2007 a montré l'importance de la combinaison des deux traitements *in vitro* sur la diminution de la prolifération et l'augmentation de l'apoptose de cellules CD34 porteuses de BCR-ABL (Burthem et al., 2007).

Il faut noter que les Mo-DC des patients LMC-PC ont une morphologie distincte (cellules petites, rondes) des Mo-DC des donneurs sains suggérant une altération d'organisation des filaments d'actine. En accord avec ces observations, une étude de 2003 montrait une différence de morphologie entre des DC générées *in vitro* à partir de monocytes des donneurs sains et de patients LMC-CP. Les cellules des sujets sains comprenaient des structures dynamiques de type « podosome » très riches en actine et jouant un rôle important dans l'adhésion et la mobilité cellulaire. En revanche, les Mo-DC des patients LMC-PC étaient rondes et le pourcentage de cellules avec une morphologie similaire aux Mo-DC des donneurs sains était fortement réduit avec une absence de podosomes (Dong et al., 2003b). De manière intéressante, dans notre modèle, le traitement des Mo-DC avec l'inhibiteur de la voie ROCK rend les cellules morphologiquement normales. Cette observation suggère l'existence d'une relation entre l'organisation de l'actine et l'oncogène BCR-ABL à travers l'activation de ROCK.

Puisque CD1d est surexprimé après la maturation terminale des DC (Fishelevich et al., 2006), nous avons choisi, dans notre modèle de différenciation, de traiter les Mo-DC avec

l'inhibiteur Y27632 au stade de la différenciation terminale lors de l'ajout de LPS. Il serait également important d'évaluer aussi un effet éventuel d'inhibiteurs de la voie Rho/ROCK sur les stades plus précoces de différenciation.

5. <u>Le défaut d'expression membranaire de CD1d des DC des patients</u> LMC-PC a-t-il des répercussions sur les fonctions des cellules iNKT?

Nous avons abordé la question de la répercussion physiopathologique du défaut d'expression membranaire de CD1d et de sa restauration sur la capacité des DC des patients à activer un hybridome iNKT (clone 2C12) *via* son TCR. Nous avons montré que les cellules Mo-DC des patients présentent moins efficacement l'antigène aux 2C12 par comparaison à celles provenant des sujets sains. De manière intéressante, la restauration de l'expression membranaire de CD1d après traitement par l'inhibiteur de ROCK est bien associée à une correction de la capacité de présentation de l' α -GalCer par les Mo-DC des patients LMC-PC. En effet, le traitement avec Y-27632 augmente significativement leur capacité à stimuler l'hybridome iNKT par comparaison à la condition sans traitement. Ces résultats suggèrent bien que la déficience de l'expression membranaire de CD1d pourrait être une cause de la déficience fonctionnelle des cellules iNKT au cours de la LMC. Cette proposition est bien en accord avec notre observation *ex-vivo* chez les patients d'une corrélation positive entre les fonctions iNKT (expression de PLZF et de la perforine) et l'expression de CD1d. Nous avons montré que cette corrélation est restreinte au TCR des cellules iNKT car elle n'est pas retrouvée avec les lymphocytes T n'exprimant pas le TCR invariant (**Figure 22**).



Figure 22 : Corrélation positive entre les fonctions des cellules iNKT et l'expression de CD1d par les DC. Le pourcentage des DC exprimant CD1d et le pourcentage des cellules iNKT (A-B) ou des lymphocytes T CD3⁺6B11⁻ (C-D) exprimant PLZF (A-C) ou la perforine (B-D) ont été analysés *ex vivo* par cytométrie en flux au sein des cellules mononucléées des patients LMC-PC au diagnostic. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du test de Spearman.

6. <u>L'altération de la présentation antigénique par CD1d résulte-t-elle</u> <u>d'un défaut d'apprêtement ?</u>

Le défaut de présentation antigénique par les Mo-DC des patients LMC-PC pourrait résulter non seulement d'un défaut d'expression de CD1d mais aussi de défauts d'apprêtement (pour «*processing* ») des antigènes. En lien avec cette question, Dong et al. (2003) ont décrit que les DC (provenant des CD34 ou des PBMC) des patients LMC-PC sont incapables de dégrader des antigènes protéiques tels que l'oxoïde du tétanos afin d'activer des clones T spécifiques des peptides correspondants (Dong et al., 2003b). De plus, les travaux de Gallo et al. (2011) ont montré un lien entre la voie Rho/ROCK et la qualité de l'apprêtement. Cela nous a permis d'émettre l'hypothèse de l'existence d'un défaut d'apprêtement dans les DC des patients LMC-PC lié à l'activation constitutive de ROCK. Pour éprouver cette hypothèse, nous avons en premier lieu vérifié les données de la littérature (Prigozy et al., 2001) selon lesquelles les DC différenciées à partir de moelle osseuse de souris activent efficacement notre hybridome iNKT lorsqu'elles sont chargées avec l'antigène α -GalGalCer, lequel est reconnu exclusivement par le TCR invariant après apprêtement dans sa forme dégradée en α -GalCer (Figure 23). Cependant, nous n'avons pas pu appliquer ce test de lecture de la capacité d'apprêtement des antigènes des cellules iNKT aux Mo-DC des patients LMC-PC. En effet, les Mo-DC de sujets sains chargées avec l'antigène α -GalGalCer se sont avérées incapables d'activer l'hybridome iNKT.



Figure 23 : Mise en place d'un test de mesure de l'apprêtement des antigènes glycolipidiques des cellules iNKT. Les DC murines différenciées à partir de la moelle osseuse (A) ou les DC humaines générées *in vitro* à partir de monocytes de deux donneurs sains (HD#1 et HD#2) ont été chargées avec 25 ng/ml d' α -GalCer (GC) ou 100 ng/ml d' α -GalCalCer (GG) pendant 16 heures puis co-cultivées avec les cellules iNKT 2C12 pendant 48 heures. La production d'IL-2 a été évaluée par ELISA.

Afin de traiter la question de l'existence du lien éventuel entre l'altération d'expression de CD1d et l'apprêtement antigénique sous l'influence du domaine DH-PH de BCR-ABL, des expériences pourront être réalisées en utilisant la lignée murine LMTK surexprimant CD1d (LMTK-CD1d) utilisée dans les travaux de Gallo et al. (2011). Les cellules LMTK-CD1d seront transfectées avec un plasmide contenant, soit l'oncogène BCR-ABL (P210) sauvage marqué avec la GFP, soit l'oncogène BCR-ABL muté dans son domaine DH-PH (P210S) qui

s'accompagne d'une perte de l'activation de la voie Rho/ROCK dépendante de BCR-ABL. La lecture sera la production d'IL-2 par les cellules iNKT 2C12 après leur co-culture avec les cellules LMTK transfectées puis chargées avec α -GalCer ou α -GalGalcer. Si un défaut d'apprêtement existe, après chargement avec α -GalGalCer, la production d'IL-2 dans la condition de co-culture avec les cellules LMTK CD1d transfectées avec P210 sera plus marquée que dans la condition de co-culture avec les cellules LMTK-CD1d transfectées avec P210.

7. <u>PPAR-γ constitue-t-il un second élément de contrôle de l'expression</u> <u>de CD1d au cours de la LMC ?</u>

L'ensemble des résultats suggèrent que la voie Rho/ROCK est impliquée dans la modification de l'expression membranaire de CD1d ainsi que possiblement dans son apprêtement dans les DC BCR-ABL(+). De manière intéressante, plusieurs fonctions des DC dépendent de PPAR-y (pour «Peroxisome Proliferator Activated Receptors») qui est une protéine de la superfamille des récepteurs nucléaires liant naturellement des lipides et agissant comme facteur de transcription régulant des gènes impliqués notamment dans le métabolisme lipidique. L'activation de PPAR- γ par son ligand augmente l'expression membranaire de CD1d des DC myéloïdes humaines, laquelle est accompagnée d'une augmentation de prolifération des cellules iNKT dans le cas où le ligand est couplé à l'a-GalCer (Szatmari et al., 2004). Cette étude montre aussi que l'activation de PPAR-y entraîne une augmentation de la capacité d'internalisation des DC ainsi que de leur efficacité de présentation des antigènes lipidiques. Par ailleurs, il est intéressant de noter que Prost et coll. (2015) ont montré que le ligand de PPAR-y est impliqué dans l'élimination des cellules quiescentes des patients PC-LMC, ceci en régulant négativement le facteur de transcription STAT5 qui a un rôle essentiel dans la maintenance de quiescence des cellules souches hématopoïétiques. De plus, l'association de l'IM avec le pioglitazone, un ligand de PPAR- γ , conduit à une diminution significative de l'expression de BCLx, BCL2 et de PIM1 (des gènes cibles de STAT5) par comparaison à l'IM seule (Prost et al., 2015). Au vu de nos résultats obtenus avec l'inhibiteur Y27632 joints aux données obtenues par Prost et coll., (2015), l'évaluation de la place de la voie Rho/ROCK dans le contrôle de la quiescence des cellules CD34 des patients LMC-PC mériterait une attention particulière.

8. <u>Le défaut d'expression membranaire de CD1d dépend du domaine</u> <u>DH-PH de BCR-ABL en modélisation *in vitro*</u>

Comme nous l'avons évoqué dans la partie 1.4 de cette discussion générale, la voie Rho/ROCK est activée par le domaine GEF de BCR-ABL, ce qui nous a conduits à vérifier si ce domaine est impliqué dans la diminution de l'expression membranaire de CD1d. Pour cela, nous avons transfecté *in vitro* des lignées murines avec le plasmide P210 ou P210S. Dans un premier temps, nous avons montré une diminution d'expression membranaire de CD1d après transfection des lignées avec P210 par comparaison à celles transfectées avec le plasmide vide. Au contraire, l'expression de CD1d dans les lignées LMTK transfectées avec la forme mutée du plasmide contenant BCR-ABL n'était pas modifiée. Cette observation constitue un argument fort en faveur de l'implication de la voie Rho/ROCK *via* le domaine DH-PH dans la diminution de l'expression de CD1d dans les DC leucémiques (Figure 24). Une autre série de résultats préliminaires montre que les lignées transfectées avec la forme mutée de BCR-ABL stimulent plus efficacement l'hybridome iNKT 2C12, comparativement à celles transfectées avec la forme WT de BCR-ABL (Figure 25).



Figure 24 : La diminution de l'expression membranaire de CD1d dans les lignées LMTK-CD1d dépend du domaine DH-PH de BCR-ABL. Les lignées LMTK-CD1d ont été transfectées en utilisant l'agent transfectant (lipofectamine) par un plasmide vide ou par le plasmide contenant l'oncogène BCR-ABL (P210) ou sa forme mutée (P210S). Après 48 heures de transfection, l'expression de CD1d a été analysée par cytométrie en flux. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du test de Student apparié.



Figure 25 : La transfection de BCR-ABL dans les cellules présentatrices LMTK-CD1d induit une altération de l'activation dépendante de CD1d d'un hybridome iNKT. Les cellules LMTK-CD1d ont été transfectées par un plasmide vide, par le plasmide contenant l'oncogène BCR-ABL (P210) ou sa forme mutée (P210S). Après 48 heures de transfection, les cellules GFP(+) ont été triées électroniquement et co-cultivées avec les cellules iNKT 2C12 et la production d'IL-2 a été analysée par ELISA. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du test de Student apparié.

9. Apport de la modélisation de la LMC in vivo chez la souris

Modélisation de l'impact du domaine DH-PH

Différentes équipes ont évalué l'implication du domaine DH-PH dans la maladie induite par l'oncogène BCR-ABL en modélisation chez la souris BALB/c irradiée en comparant l'effet différentiel des formes BCR-ABL sauvage et mutée au niveau du domaine DH-PH. Comparativement à la forme WT, la forme mutée induit une leucémie plus sévère, d'un phénotype proche d'une leucémie myéloïde aiguë. En effet, les souris injectées avec des cellules transfectées avec P210 survivent plus longtemps que celles injectées avec les cellules portant la forme mutée (Tala et al., 2013). Dans le laboratoire, nous avons obtenu le même profil de résultats dans un modèle des souris C57Bl/6 rendues immunoincompétentes par une injection de busulfan et reconstituées avec des cellules portant BCR-ABL avec la forme WT ou mutée. Nous avons pris appui sur ce modèle afin d'étudier l'expression membranaire de CD1d dans les DC leucémiques (identifiées BCR-ABL(+) sur la base de leur expression du traceur GFP) de la rate après 3 à 5 semaines d'induction de la maladie. Nous avons ainsi montré une diminution de l'expression de CD1d dans les cellules non leucémiques. En revanche, aucune différence n'a été retrouvée lorsqu'on considère les cellules transfectées avec la forme BCR-ABL mutée (Figure 26).

Enfin, nos résultats préliminaires montrent que le pourcentage et le statut d'activation des cellules iNKT (déterminé par le niveau d'expression de CD69) ne différent pas entre les souris WT transfectées par un plasmide vide ou par la forme BCR-ABL mutée ou non. Ces résultats pourraient être expliqués par une compensation fonctionnelle apportée par le pool endogène de DC.

Modélisation de l'impact des cellules iNKT

A notre connaissance, la littérature ne documente pas d'étude du rôle anti-tumoral des cellules iNKT dans les modèles disponibles de LMC chez l'animal. La principale raison est que ces modèles utilisent des animaux dont le système immunitaire a été, sinon détruit, au moins altéré par un traitement immunosuppresseur.

Afin de comprendre le rôle des lymphocytes iNKT au cours de la leucémogenèse et de la réponse immune anti-leucémique, nous avons utilisé notre modèle d'induction d'un syndrome myéloprolifératif appliqué à des souris immunocompétentes. Dans ce modèle, environ 50% des souris développent en 3 semaines la maladie au lieu de 100% des souris après leur irradiation par rayons γ (données du laboratoire non publiées). Nous avons donc induit la maladie chez des souris C57Bl/6 déficientes en cellules iNKT (J α 18 KO) ou WT en injectant des progéniteurs hématopoïétiques préalablement transduits avec BCR-ABL. Nous n'avons pas pu montrer un rôle protecteur des cellules iNKT dans le développement de la maladie. En effet, aucune différence n'a pu être observée entre les groupes de souris C57Bl/6 WT et J α 18KO en termes de cinétique d'apparition de la maladie et de survie. Précisément, une seule expérience sur un total de 3 a montré un développement plus rapide de la maladie chez les souris J α 18 KO comparativement aux souris WT. La différence du nombre des cellules souches BCR-ABL positives injectées d'une expérience à l'autre pour induire la maladie pourrait expliquer la non homogénéité des résultats obtenus.



Figure 26 : L'altération de l'expression membranaire de CD1d par les DC myéloïdes BCR-ABL(+) est dépendante de l'activité RhoGEF. Des progéniteurs de la moelle osseuse de souris C57Bl/6 ont été transduits par un rétrovirus codant pour MSCV-bcrabl/p210-IRES-gfp ou MSCV-bcr-abl/p210(S509A)-IRES-GFP. Les cellules GFP-positives obtenues par tri électronique ont été injectées par voie intraveineuse à des animaux receveurs traités au préalable par du busulfan. Le pourcentage des cellules CD1d-positives parmi les DC myéloïdes spléniques GFP(+) ou GFP(-) a été déterminé par cytométrie en flux.

10.<u>Les cellules NK constituent un verrou immunitaire contre le</u> <u>développement de la LMC chez la souris</u>

L'ensemble des résultats obtenus montrant que dans notre modèle animal les cellules iNKT sont probablement dispensables dans le contrôle de la leucémie pose la question de l'existence d'un rôle des cellules NK dans la protection contre la maladie. En effet, selon les modèles anti-tumoraux et les conditions expérimentales, les cellules iNKT et les cellules NK agissent, soit en concertation, soit de manière indépendante avec un rôle prépondérant des cellules NK.

Chez l'homme, plusieurs travaux ont étudié le statut des cellules NK et montré une déficience fonctionnelle et numérique des cellules NK au cours de la LMC. Une diminution progressive du nombre de ces cellules est associée à la progression de la maladie de la phase chronique à la phase blastique (Chiorean et al., 2003). Nos données non publiées montrent que les cellules NK des patients LMC-PC produisent très peu l'IFN- γ en réponse à une stimulation par les cytokines IL-12 et IL-18 par comparaison aux sujets sains. De plus, nous avons montré une diminution de la dégranulation des cellules NK en réponse à une stimulation par un anticorps dirigé contre la molécule CD16 chez les patients LMC-PC par rapport aux donneurs sains (Manuscrit 4, données non publiées). Une restauration de ces fonctions a été observée chez les patients en rémission après traitement par IM.

Ces résultats montrent l'existence d'un défaut des fonctions des cellules NK au cours de la phase chronique de la LMC. Notre modèle expérimental murin de LMC chez la souris immunocompétente apporte la démonstration *princeps* du rôle essentiel des cellules NK dans la protection de la maladie, ceci en montrant une relation directe de cause à effet entre la déplétion des cellules NK et l'échappement de la maladie. En effet, la déplétion des cellules NK par l'anticorps anti-asialo GM1 après induction de la maladie entraîne un développement plus rapide du syndrome leucémique chez toutes les souris par comparaison aux souris non injectées avec l'agent déplétant les cellules NK (**Figure 27**). Ces résultats joints à ceux obtenus chez les souris déficientes en cellules iNKT décrits dans le paragraphe 1.9 n'excluent pas un rôle des cellules iNKT, soit coopératif, soit redondant avec les cellules NK dans le contrôle de la leucémie. L'hypothèse d'une coopération NK/iNKT dans la réponse anti-leucémique pourrait être évaluée en comparant l'incidence de la maladie chez des souris J α 18 KO développeront la maladie plus rapidement dans le contrôle de la maladie, les souris J α 18 KO développeront la maladie plus rapidement que les souris WT.



Figure 27 : Mise en évidence d'un verrou immunologique dépendant des cellules NK. Des cellules de moelle osseuse transduites par un vecteur exprimant BCR-ABL ont été injectées à des souris immunocompétentes naïves (non irradiées) traitées (courbe rouge, n=5) ou non (courbe noire, n=5) par l'anticorps anti-asialo GM1. Les courbes de survies sont le résultat de trois expériences séparées. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du test de Mantel-Cox.

II- Répercussions physiopathologiques du défaut des cellules iNKT dans la dynamique de la réponse T innée dans la LMC

Chez la souris, il a été mis en évidence des cellules T CD8⁺ Eomes⁺ IMP et VM exprimant des marqueurs à la fois des cellules mémoires et des cellules NK. Sur le plan fonctionnel, ces cellules produisent rapidement l'IFN- γ en réponse à une stimulation innée par la combinaison de cytokines pro-inflammatoires IL-12 et IL-18.

Dans ce travail, nous avons montré l'existence chez l'homme d'une population de cellules T CD8⁺ similaire à celle décrite chez la souris. En effet, ces cellules expriment Eomes et des marqueurs des cellules NK (KIR/NKG2A) et des cellules mémoires de type EMRA. De plus, ces cellules T CD8⁺ Eomes⁺ KIR/NKG2A⁺ sont capables de produire l'IFN-γ en réponse aux cytokines IL-12/IL-18. Elles possèdent un arsenal cytotoxique et dégranulent après une stimulation par un anticorps agoniste dirigé contre la molécule CD16. Leur caractère inné a été validé en montrant l'existence de cellules T CD8⁺IMP-like dans le sang de cordon ayant en majorité un phénotype de type EMRA. Les fonctions cytotoxiques de ces cellules posent la question de leur rôle dans l'évolution des cancers. Des résultats préliminaires montrent la présence de ces cellules T CD8⁺ Eomes⁺ KIR/NKG2A⁺ dans les ganglions drainants chez des patients atteints du cancer du sein ou des ovaires (données personnelles d'André Herbelin & Jean-Marc Gombert et d'Eliane Piaggio (Institut Curie, Paris)). Il serait intéressant d'évaluer la fréquence de ces cellules dans les ganglions normaux dans le but de déterminer le rôle de ces cellules.

Afin de comprendre le rôle des cellules T CD8⁺ innées au cours de la réponse immune anticancéreuse, des expériences pourraient être menées dans un modèle murin de tumeur. Un des modèles les plus utilisés chez la souris est le mélanome B16, un cancer cutané qui métastase dans le foie. Ce modèle a largement été mis à profit dans le but d'évaluer le rôle des cellules iNKT dans les cancers (Cui et al., 1997). Des expériences de reconstitution en cellules T CD8⁺ IMP/VM pourraient être réalisées chez des souris RAG2^{-/-}afin d'étudier le rôle des cellules T CD8 innées dans le contrôle du mélanome B16. Nous avons mis en évidence dans les cellules iNKT des patients LMC-PC une diminution de l'expression de PLZF. Ce facteur de transcription joue un rôle important dans l'acquisition des caractères innés des cellules iNKT, surtout la production d'IL-4 et d'IFN-y. Chez les patients LMC-PC, la diminution de l'expression de PLZF est accompagnée d'un défaut de production d'IL-4. Une restauration de l'expression de PLZF et d'IL-4 a été observée chez les patients ayant obtenu une réponse cytogénétique complète après traitement par l'IM. Un argument fort en faveur de la dépendance de la différenciation des cellules T CD8⁺ innées des cellules T exprimant PLZF et productrices d'IL-4 est la corrélation positive entre l'expression d'Eomes dans les cellules T CD8⁺ KIR/NKG2A⁺ et l'expression de PLZF par les cellules iNKT dans une cohorte composée de donneurs sains, de patients LMC-PC et traités. Nous avons aussi montré une diminution de la fréquence des cellules T CD8⁺ Eomes⁺ KIR/NKG2A⁺ et de l'expression d'Eomes au sein des cellules T CD8⁺ KIR/NKG2A⁺ chez les patients LMC-PC par comparaison aux sujets sains. En plus du défaut numérique, nous avons mis en évidence des défauts fonctionnels. En effet, les cellules T CD8⁺ Eomes⁺ KIR/NKG2A⁺ des patients LMC-PC ne prolifèrent pas en réponse à une stimulation par l'IL-15 et ne produisent pas l'IFN-γ en réponse à une stimulation innée par le couple IL-12 et IL-18 par comparaison à des donneurs sains tandis que leur arsenal cytotoxique et leur capacité de dégranulation en réponse à une stimulation par l'anti-CD16 sont diminués. Ces défauts ont été restaurés chez les patients traités par IM.

Comme nous l'avons évoqué, chez les souris déficientes pour la protéine Itk, une tyrosine kinase de la famille de Tec, un nombre élevé de cellules T $CD8^+$ IMP a été observé. Le Dasatinib, en plus de son inhibition de l'activité tyrosine kinase de BCR-ABL, inhibe l'activité de certaines kinases de la famille Tec. Sur la base de ces données, notre hypothèse est que le Dasatinib pourrait participer à la génération des cellules T $CD8^+$ innées chez les patients LMC traités par cet ITK de seconde génération. A cet égard, chez certains patients traités par le Dasatinib, il a été noté une hyperlymphocytose en partie expliquée par une accumulation de cellules T $CD8^+$ non conventionnelles (exprimant des marqueurs des cellules NK) et/ou ayant des caractéristiques morphologiques de grands lymphocytes granuleux (GLG) qui est associée à un meilleur pronostic. Des résultats préliminaires obtenus au laboratoire montrent une augmentation des GLG par rapport à ceux n'ayant pas de GLG. Il est important de noter que cette fréquence est même supérieure à celle observée chez les donneurs sains et équivalente à celle observée chez les patients traités par IFN- α (**Figure 28**).

Il serait intéressant chez ces patients d'analyser le statut des cellules iNKT. Par ailleurs, des expériences pourraient être menées chez la souris pour évaluer directement la capacité du Dasatinib à générer des cellules T CD8⁺ de phénotype similaire à celui décrit chez les souris déficientes en Tec kinases. Si comme chez les patients LMC, une accumulation des cellules T CD8⁺ IMP est montrée en réponse au traitement, il serait intéressant de vérifier si la génération de ces cellules est dépendante des cellules iNKT en injectant du Dasatinib chez les souris Jα18 KO. Pour apporter une démonstration définitive d'une activité anti-leucémique des cellules T CD8⁺ mémoires innées, nous nous proposons d'utiliser notre modèle murin immunocompétent d'induction de la LMC en déplétant totalement les lymphocytes T CD8⁺. Puis, une reconstitution du compartiment T CD8 inné pourrait être réalisée avec des cellules CD8⁺ CD122⁺ GFP⁺ provenant des souris transgéniques Eomes-GFP traitées au préalable ou non avec le Dasatinib.



Figure 28 : Les cellules de patients avec GLG traités par Dasatinib ont un pourcentage augmenté de cellules Eomes⁺ parmi les cellules T CD8⁺. Les cellules T CD8⁺ exprimant Eomes ont été analysées *ex vivo* par cytométrie en flux au sein des cellules mononucléées de DS (n=17) ou de patients en rémission cytogénétique complète après traitement par Dasatinib et présentant (D_{GLG}, n=4) ou non (D_{NOGLG}, n=7) des GLG ou traités par IFN α (n=5). L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du test non paramétrique de Mann-Whitney.

En conclusion finale, comme nous l'avons évoqué dans l'introduction générale, la majorité des patients atteints de LMC traités par ITK rechutent après arrêt de leur traitement du fait de l'existence d'une masse tumorale résiduelle.

L'ensemble des résultats de la première partie de notre travail permet de proposer un ciblage thérapeutique de la voie Rho/ROCK pour restaurer les fonctions des DC et *in fine* corriger les défauts des lymphocytes T innés (iNKT et T CD8⁺ innés) au cours de la phase chronique de la LMC. Sur la base de ces résultats acquis, nous postulons que la combinaison d'un traitement inhibant la voie Rho/ROCK avec les ITK permettrait de pérenniser les rémissions observées chez les patients traités par ITK seul. Un tel traitement combiné, en favorisant le retour d'une immunosurveillance efficace, permettrait de contrôler les cellules leucémiques résiduelles en revenant à une phase d'équilibre entre le système immunitaire et la leucémie.

La deuxième partie de notre travail jointe aux données de la littérature permettent de suggérer que le Dasatinib induit une immunité spécifique anti-leucémique en générant des cellules T CD8⁺ innées par la mise en jeu des cellules iNKT. Dans l'affirmative, les cellules T CD8⁺ innées et les cellules iNKT pourraient alors constituer des marqueurs cellulaires prédictifs d'une rémission moléculaire pérenne après arrêt des ITK.
Référence Bibliographiques

Airoldi, I., Di Carlo, E., Cocco, C., Sorrentino, C., Fais, F., Cilli, M., D'Antuono, T., Colombo, M.P., Colombo, M.P., and Pistoia, V. (2005). Lack of Il12rb2 signaling predisposes to spontaneous autoimmunity and malignancy. Blood *106*, 3846–3853.

Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006). Pathogen Recognition and Innate Immunity. Cell *124*, 783–801.

Akue, A.D., Lee, J.-Y., and Jameson, S.C. (2012). Derivation and Maintenance of Virtual Memory CD8 T Cells. J. Immunol. *188*, 2516–2523.

Altman, J.B., Benavides, A.D., Das, R., and Bassiri, H. (2015). Antitumor Responses of Invariant Natural Killer T Cells. J. Immunol. Res. 2015, 652875.

Appel, S., Boehmler, A.M., Grünebach, F., Müller, M.R., Rupf, A., Weck, M.M., Hartmann, U., Reichardt, V.L., Kanz, L., Brümmendorf, T.H., et al. (2004). Imatinib mesylate affects the development and function of dendritic cells generated from CD34+ peripheral blood progenitor cells. Blood *103*, 538–544.

Appel, S., Rupf, A., Weck, M.M., Schoor, O., Brümmendorf, T.H., Weinschenk, T., Grünebach, F., and Brossart, P. (2005). Effects of Imatinib on Monocyte-Derived Dendritic Cells Are Mediated by Inhibition of Nuclear Factor-κB and Akt Signaling Pathways. Clin. Cancer Res. *11*, 1928–1940.

Baccarani, M., Saglio, G., Goldman, J., Hochhaus, A., Simonsson, B., Appelbaum, F., Apperley, J., Cervantes, F., Cortes, J., Deininger, M., et al. (2006). Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. Blood *108*, 1809–1820.

Baev, D.V., Peng, X.-H., Song, L., Barnhart, J.R., Crooks, G.M., Weinberg, K.I., and Metelitsa, L.S. (2004). Distinct homeostatic requirements of CD4+ and CD4- subsets of Valpha24-invariant natural killer T cells in humans. Blood *104*, 4150–4156.

Balachandran, V.P., Cavnar, M.J., Zeng, S., Bamboat, Z.M., Ocuin, L.M., Obaid, H., Sorenson, E.C., Popow, R., Ariyan, C., Rossi, F., et al. (2011). Imatinib potentiates antitumor T cell responses in gastrointestinal stromal tumor through the inhibition of Ido. Nat. Med. *17*, 1094–1100.

Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., Pulendran, B., and Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. Annu. Rev. Immunol. *18*, 767–811.

Bendelac, A., Rivera, M.N., Park, S.H., and Roark, J.H. (1997). Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function. Annu. Rev. Immunol. *15*, 535–562.

Bendelac, A., Savage, P.B., and Teyton, L. (2007a). The Biology of NKT Cells. Annu. Rev. Immunol. *25*, 297–336.

Bendelac, A., Savage, P.B., and Teyton, L. (2007b). The biology of NKT cells. Annu. Rev. Immunol. 25, 297–336.

Berzins, S.P., Cochrane, A.D., Pellicci, D.G., Smyth, M.J., and Godfrey, D.I. (2005). Limited correlation between human thymus and blood NKT cell content revealed by an ontogeny study of paired tissue samples. Eur. J. Immunol. *35*, 1399–1407.

Bezbradica, J.S., Hill, T., Stanic, A.K., Van Kaer, L., and Joyce, S. (2005). Commitment toward the natural T (iNKT) cell lineage occurs at the CD4+8+ stage of thymic ontogeny. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *102*, 5114–5119.

Bjordahl, R.L., Gapin, L., Marrack, P., and Refaeli, Y. (2012). iNKT cells suppress the CD8+ T cell response to a murine Burkitt's-like B cell lymphoma. PloS One 7, e42635.

Björkström, N.K., Béziat, V., Cichocki, F., Liu, L.L., Levine, J., Larsson, S., Koup, R.A., Anderson, S.K., Ljunggren, H.-G., and Malmberg, K.-J. (2012). CD8 T cells express randomly selected KIRs with distinct specificities compared with NK cells. Blood *120*, 3455–3465.

Bocchia, M., Defina, M., Aprile, L., Ippoliti, M., Crupi, R., Rondoni, M., Gozzetti, A., and Lauria, F. (2010). Complete molecular response in CML after p210 BCR-ABL1-derived peptide vaccination. Nat. Rev. Clin. Oncol. 7, 600–603.

Boissel, N., Rea, D., Tieng, V., Dulphy, N., Brun, M., Cayuela, J.-M., Rousselot, P., Tamouza, R., Le Bouteiller, P., Mahon, F.-X., et al. (2006). BCR/ABL oncogene directly controls MHC class I chain-related molecule A expression in chronic myelogenous leukemia. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *176*, 5108–5116.

Bonifazi, F., de Vivo, A., Rosti, G., Guilhot, F., Guilhot, J., Trabacchi, E., Hehlmann, R., Hochhaus, A., Shepherd, P.C., Steegmann, J.L., et al. (2001). Chronic myeloid leukemia and interferon-alpha: a study of complete cytogenetic responders. Blood *98*, 3074–3081.

Braumüller, H., Wieder, T., Brenner, E., Aßmann, S., Hahn, M., Alkhaled, M., Schilbach, K., Essmann, F., Kneilling, M., Griessinger, C., et al. (2013). T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence. Nature 494, 361–365.

Brennan, P.J., Brigl, M., and Brenner, M.B. (2013). Invariant natural killer T cells: an innate activation scheme linked to diverse effector functions. Nat. Rev. Immunol. *13*, 101–117.

Brossay, L., Jullien, D., Cardell, S., Sydora, B.C., Burdin, N., Modlin, R.L., and Kronenberg, M. (1997). Mouse CD1 is mainly expressed on hemopoietic-derived cells. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *159*, 1216–1224.

Brossay, L., Chioda, M., Burdin, N., Koezuka, Y., Casorati, G., Dellabona, P., and Kronenberg, M. (1998). CD1d-mediated recognition of an alpha-galactosylceramide by natural killer T cells is highly conserved through mammalian evolution. J. Exp. Med. *188*, 1521–1528.

Broussard, C., Fleischacker, C., Fleischecker, C., Horai, R., Chetana, M., Venegas, A.M., Sharp, L.L., Hedrick, S.M., Fowlkes, B.J., and Schwartzberg, P.L. (2006). Altered development of CD8+ T cell lineages in mice deficient for the Tec kinases Itk and Rlk. Immunity *25*, 93–104.

Brown, S., Hutchinson, C.V., Aspinall-O'Dea, M., Whetton, A.D., Johnson, S.M., Rees-Unwin, K., and Burthem, J. (2014). Monocyte-derived dendritic cells from chronic myeloid leukaemia have abnormal maturation and cytoskeletal function that is associated with defective localisation and signalling by normal ABL1 protein. Eur. J. Haematol. *93*, 96–102.

Budd, R.C., Miescher, G.C., Howe, R.C., Lees, R.K., Bron, C., and MacDonald, H.R. (1987). Developmentally regulated expression of T cell receptor beta chain variable domains in immature thymocytes. J. Exp. Med. *166*, 577–582.

Burchert, A., and Neubauer, A. (2005). Interferon a and T-cell responses in chronic myeloid leukemia. Leuk. Lymphoma *46*, 167–175.

Burchert, A., Wölfl, S., Schmidt, M., Brendel, C., Denecke, B., Cai, D., Odyvanova, L., Lahaye, T., Müller, M.C., Berg, T., et al. (2003). Interferon- α , but not the ABL-kinase inhibitor imatinib (STI571), induces expression of myeloblastin and a specific T-cell response in chronic myeloid leukemia. Blood *101*, 259–264.

Burthem, J., Rees-Unwin, K., Mottram, R., Adams, J., Lucas, G.S., Spooncer, E., and Whetton, A.D. (2007). The rho-kinase inhibitors Y-27632 and fasudil act synergistically with imatinib to inhibit the expansion of ex vivo CD34(+) CML progenitor cells. Leukemia *21*, 1708–1714.

Carnaud, C., Lee, D., Donnars, O., Park, S.H., Beavis, A., Koezuka, Y., and Bendelac, A. (1999). Cutting edge: Cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *163*, 4647–4650.

Catellani, S., Pierri, I., Gobbi, M., Poggi, A., and Zocchi, M.R. (2011). Imatinib treatment induces CD5+ B lymphocytes and IgM natural antibodies with anti-leukemic reactivity in patients with chronic myelogenous leukemia. PloS One *6*, e18925.

Cebo, C., Da Rocha, S., Wittnebel, S., Turhan, A.G., Abdelali, J., Caillat-Zucman, S., Bourhis, J.H., Chouaib, S., and Caignard, A. (2006). The decreased susceptibility of Bcr/Abl targets to NK cell-mediated lysis in response to imatinib mesylate involves modulation of NKG2D ligands, GM1 expression, and synapse formation. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *176*, 864–872.

Ceredig, R., Lynch, F., and Newman, P. (1987). Phenotypic properties, interleukin 2 production, and developmental origin of a "mature" subpopulation of Lyt-2- L3T4- mouse thymocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *84*, 8578–8582.

Cernadas, M., Sugita, M., van der Wel, N., Cao, X., Gumperz, J.E., Maltsev, S., Besra, G.S., Behar, S.M., Peters, P.J., and Brenner, M.B. (2003). Lysosomal localization of murine CD1d

mediated by AP-3 is necessary for NK T cell development. J. Immunol. Baltim. Md 1950 171, 4149-4155.

Chan, A.C., Leeansyah, E., Cochrane, A., d'Udekem d'Acoz, Y., Mittag, D., Harrison, L.C., Godfrey, D.I., and Berzins, S.P. (2013). Ex-vivo analysis of human natural killer T cells demonstrates heterogeneity between tissues and within established CD4(+) and CD4(-) subsets. Clin. Exp. Immunol. *172*, 129–137.

Chang, P.-P., Barral, P., Fitch, J., Pratama, A., Ma, C.S., Kallies, A., Hogan, J.J., Cerundolo, V., Tangye, S.G., Bittman, R., et al. (2012). Identification of Bcl-6-dependent follicular helper NKT cells that provide cognate help for B cell responses. Nat. Immunol. *13*, 35–43.

Chen, C.I.-U., Koschmieder, S., Kerstiens, L., Schemionek, M., Altvater, B., Pscherer, S., Gerss, J., Maecker, H.T., Berdel, W.E., Juergens, H., et al. (2012). NK cells are dysfunctional in human chronic myelogenous leukemia before and on imatinib treatment and in BCR-ABL-positive mice. Leukemia *26*, 465–474.

Chen, X., Wang, X., Besra, G.S., and Gumperz, J.E. (2007). Modulation of CD1d-restricted NKT cell responses by CD4. J. Leukoc. Biol. *82*, 1455–1465.

Chiorean, E.G., Dylla, S.J., Olsen, K., Lenvik, T., Soignier, Y., and Miller, J.S. (2003). BCR/ABL alters the function of NK cells and the acquisition of killer immunoglobulin-like receptors (KIRs). Blood *101*, 3527–3533.

Clark, R.E., Dodi, I.A., Hill, S.C., Lill, J.R., Aubert, G., Macintyre, A.R., Rojas, J., Bourdon, A., Bonner, P.L., Wang, L., et al. (2001). Direct evidence that leukemic cells present HLA-associated immunogenic peptides derived from the BCR-ABL b3a2 fusion protein. Blood *98*, 2887–2893.

Clementi, R., Locatelli, F., Dupré, L., Garaventa, A., Emmi, L., Bregni, M., Cefalo, G., Moretta, A., Danesino, C., Comis, M., et al. (2005). A proportion of patients with lymphoma may harbor mutations of the perforin gene. Blood *105*, 4424–4428.

Constantinides, M.G., and Bendelac, A. (2013). Transcriptional regulation of the NKT cell lineage. Curr. Opin. Immunol. *25*, 161–167.

Cretney, E., Street, S.E.A., and Smyth, M.J. (2002). TNF contributes to the immunopathology of perforin/Fas ligand double deficiency. Immunol. Cell Biol. *80*, 436–440.

Crowe, N.Y., Coquet, J.M., Berzins, S.P., Kyparissoudis, K., Keating, R., Pellicci, D.G., Hayakawa, Y., Godfrey, D.I., and Smyth, M.J. (2005). Differential antitumor immunity mediated by NKT cell subsets in vivo. J. Exp. Med. *202*, 1279–1288.

Cui, J., Shin, T., Kawano, T., Sato, H., Kondo, E., Toura, I., Kaneko, Y., Koseki, H., Kanno, M., and Taniguchi, M. (1997). Requirement for Valpha14 NKT cells in IL-12-mediated rejection of tumors. Science *278*, 1623–1626.

Daley, G.Q., Van Etten, R.A., and Baltimore, D. (1990). Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. Science *247*, 824–830.

Dalod, M., Chelbi, R., Malissen, B., and Lawrence, T. (2014). Dendritic cell maturation: functional specialization through signaling specificity and transcriptional programming. EMBO J. *33*, 1104–1116.

Das, R., Sant'Angelo, D.B., and Nichols, K.E. (2010). Transcriptional control of invariant NKT cell development. Immunol. Rev. 238, 195–215.

Dascher, C.C., and Brenner, M.B. (2003). Evolutionary constraints on CD1 structure: insights from comparative genomic analysis. Trends Immunol. *24*, 412–418.

Daubon, T., Chasseriau, J., El Ali, A., Rivet, J., Kitzis, A., Constantin, B., and Bourmeyster, N. (2008). Differential motility of p190bcr-abl- and p210bcr-abl-expressing cells: respective roles of Vav and Bcr-Abl GEFs. Oncogene *27*, 2673–2685.

Davidson, W.F., Giese, T., and Fredrickson, T.N. (1998). Spontaneous development of plasmacytoid tumors in mice with defective Fas-Fas ligand interactions. J. Exp. Med. *187*, 1825–1838.

De Santo, C., Salio, M., Masri, S.H., Lee, L.Y.-H., Dong, T., Speak, A.O., Porubsky, S., Booth, S., Veerapen, N., Besra, G.S., et al. (2008). Invariant NKT cells reduce the immunosuppressive activity of influenza A virus-induced myeloid-derived suppressor cells in mice and humans. J. Clin. Invest. *118*, 4036–4048.

De Santo, C., Arscott, R., Booth, S., Karydis, I., Jones, M., Asher, R., Salio, M., Middleton, M., and Cerundolo, V. (2010). Invariant NKT cells modulate the suppressive activity of IL-10-secreting neutrophils differentiated with serum amyloid A. Nat. Immunol. *11*, 1039–1046.

Deininger, M.W., Goldman, J.M., and Melo, J.V. (2000). The molecular biology of chronic myeloid leukemia. Blood *96*, 3343–3356.

Delannoy, A. (2006). Leucémie lymphoblastique aiguë Philadelphie-positive. Hématologie *12*, 26–31.

Dellabona, P., Casorati, G., Friedli, B., Angman, L., Sallusto, F., Tunnacliffe, A., Roosneek, E., and Lanzavecchia, A. (1993). In vivo persistence of expanded clones specific for bacterial antigens within the human T cell receptor alpha/beta CD4-8- subset. J. Exp. Med. *177*, 1763–1771.

Dellabona, P., Padovan, E., Casorati, G., Brockhaus, M., and Lanzavecchia, A. (1994). An invariant V alpha 24-J alpha Q/V beta 11 T cell receptor is expressed in all individuals by clonally expanded CD4-8- T cells. J. Exp. Med. *180*, 1171–1176.

Devergie, A., Reiffers, J., Vernant, J.P., Herve, P., Guyotat, D., Maraninchi, D., Rio, B., Michallet, M., Jouet, J.P., and Milpied, N. (1990). Long-term follow-up after bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia: factors associated with relapse. Bone Marrow Transplant. *5*, 379–386.

Dhodapkar, M.V., Geller, M.D., Chang, D.H., Shimizu, K., Fujii, S.-I., Dhodapkar, K.M., and Krasovsky, J. (2003). A reversible defect in natural killer T cell function characterizes the progression of premalignant to malignant multiple myeloma. J. Exp. Med. *197*, 1667–1676.

Donato, N.J., Wu, J.Y., Stapley, J., Gallick, G., Lin, H., Arlinghaus, R., and Talpaz, M. (2003). BCR-ABL independence and LYN kinase overexpression in chronic myelogenous leukemia cells selected for resistance to STI571. Blood *101*, 690–698.

Dong, R., Cwynarski, K., Entwistle, A., Marelli-Berg, F., Dazzi, F., Simpson, E., Goldman, J.M., Melo, J.V., Lechler, R.I., Bellantuono, I., et al. (2003a). Dendritic cells from CML patients have altered actin organization, reduced antigen processing, and impaired migration. Blood *101*, 3560–3567.

Dong, R., Cwynarski, K., Entwistle, A., Marelli-Berg, F., Dazzi, F., Simpson, E., Goldman, J.M., Melo, J.V., Lechler, R.I., Bellantuono, I., et al. (2003b). Dendritic cells from CML patients have altered actin organization, reduced antigen processing, and impaired migration. Blood *101*, 3560–3567.

Dulucq, S., Bouchet, S., Turcq, B., Lippert, E., Etienne, G., Reiffers, J., Molimard, M., Krajinovic, M., and Mahon, F.-X. (2008). Multidrug resistance gene (MDR1) polymorphisms are associated with major molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia. Blood *112*, 2024–2027.

Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. Nat. Immunol. *3*, 991–998.

Dunn, G.P., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2004). The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. Immunity *21*, 137–148.

Dunn, G.P., Bruce, A.T., Sheehan, K.C.F., Shankaran, V., Uppaluri, R., Bui, J.D., Diamond, M.S., Koebel, C.M., Arthur, C., White, J.M., et al. (2005). A critical function for type I interferons in cancer immunoediting. Nat. Immunol. *6*, 722–729.

DuPage, M., Mazumdar, C., Schmidt, L.M., Cheung, A.F., and Jacks, T. (2012). Expression of tumour-specific antigens underlies cancer immunoediting. Nature *482*, 405–409.

Dutta, M., Kraus, Z.J., Gomez-Rodriguez, J., Hwang, S.-H., Cannons, J.L., Cheng, J., Lee, S.-Y., Wiest, D.L., Wakeland, E.K., and Schwartzberg, P.L. (2013). A role for Ly108 in the induction of promyelocytic zinc finger transcription factor in developing thymocytes. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *190*, 2121–2128.

Eibl, B., Ebner, S., Duba, C., Böck, G., Romani, N., Erdel, M., Gächter, A., Niederwieser, D., and Schuler, G. (1997). Dendritic cells generated from blood precursors of chronic myelogenous leukemia patients carry the Philadelphia translocation and can induce a CML-specific primary cytotoxic T-cell response. Genes. Chromosomes Cancer *20*, 215–223.

Eisendle, K., Lang, A., Eibl, B., Nachbaur, D., Glassl, H., Fiegl, M., Thaler, J., and Gastl, G. (2003). Phenotypic and functional deficiencies of leukaemic dendritic cells from patients with chronic myeloid leukaemia. Br. J. Haematol. *120*, 63–73.

Elewaut, D., Lawton, A.P., Nagarajan, N.A., Maverakis, E., Khurana, A., Honing, S., Benedict, C.A., Sercarz, E., Bakke, O., Kronenberg, M., et al. (2003). The adaptor protein AP-3 is required for CD1d-mediated antigen presentation of glycosphingolipids and development of Valpha14i NKT cells. J. Exp. Med. *198*, 1133–1146.

Emoto, M., Mittrücker, H.W., Schmits, R., Mak, T.W., and Kaufmann, S.H. (1999). Critical role of leukocyte function-associated antigen-1 in liver accumulation of CD4+NKT cells. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *162*, 5094–5098.

Exley, M., Garcia, J., Balk, S.P., and Porcelli, S. (1997). Requirements for CD1d recognition by human invariant Valpha24+ CD4-CD8- T cells. J. Exp. Med. *186*, 109–120.

Faderl, S., Talpaz, M., Estrov, Z., and Kantarjian, H.M. (1999). Chronic myelogenous leukemia: biology and therapy. Ann. Intern. Med. *131*, 207–219.

Figdor, C.G., van Kooyk, Y., and Adema, G.J. (2002). C-type lectin receptors on dendritic cells and langerhans cells. Nat. Rev. Immunol. *2*, 77–84.

Fischer, K., Scotet, E., Niemeyer, M., Koebernick, H., Zerrahn, J., Maillet, S., Hurwitz, R., Kursar, M., Bonneville, M., Kaufmann, S.H.E., et al. (2004). Mycobacterial phosphatidylinositol mannoside is a natural antigen for CD1d-restricted T cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *101*, 10685–10690.

Fowlkes, B.J., Kruisbeek, A.M., Ton-That, H., Weston, M.A., Coligan, J.E., Schwartz, R.H., and Pardoll, D.M. (1987). A novel population of T-cell receptor alpha beta-bearing thymocytes which predominantly expresses a single V beta gene family. Nature *329*, 251–254.

Fox, L.M., Cox, D.G., Lockridge, J.L., Wang, X., Chen, X., Scharf, L., Trott, D.L., Ndonye, R.M., Veerapen, N., Besra, G.S., et al. (2009). Recognition of lyso-phospholipids by human natural killer T lymphocytes. PLoS Biol. *7*, e1000228.

Fujii, S.-I., Shimizu, K., Smith, C., Bonifaz, L., and Steinman, R.M. (2003). Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide rapidly induces the full maturation of dendritic cells in vivo and thereby acts as an adjuvant for combined CD4 and CD8 T cell immunity to a coadministered protein. J. Exp. Med. *198*, 267–279.

Gabriele, L., Borghi, P., Rozera, C., Sestili, P., Andreotti, M., Guarini, A., Montefusco, E., Foà, R., and Belardelli, F. (2004). IFN-alpha promotes the rapid differentiation of monocytes from patients with chronic myeloid leukemia into activated dendritic cells tuned to undergo full maturation after LPS treatment. Blood *103*, 980–987.

Gallo, R.M., Khan, M.A., Shi, J., Kapur, R., Wei, L., Bailey, J.C., Liu, J., and Brutkiewicz, R.R. (2012). Regulation of the actin cytoskeleton by Rho kinase controls antigen presentation by CD1d. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *189*, 1689–1698.

Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pagès, C., Tosolini, M., Camus, M., Berger, A., Wind, P., et al. (2006). Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. Science *313*, 1960–1964.

Galon, J., Angell, H.K., Bedognetti, D., and Marincola, F.M. (2013). The continuum of cancer immunosurveillance: prognostic, predictive, and mechanistic signatures. Immunity *39*, 11–26.

Gambacorti-Passerini, C., le Coutre, P., Mologni, L., Fanelli, M., Bertazzoli, C., Marchesi, E., Di Nicola, M., Biondi, A., Corneo, G.M., Belotti, D., et al. (1997). Inhibition of the ABL kinase activity blocks the proliferation of BCR/ABL+ leukemic cells and induces apoptosis. Blood Cells. Mol. Dis. *23*, 380–394.

Gapin, L. (2016). Development of invariant natural killer T cells. Curr. Opin. Immunol. 39, 68–74.

Garber, H.R., Mirza, A., Mittendorf, E.A., and Alatrash, G. (2014). Adoptive T-cell therapy for Leukemia. Mol. Cell. Ther. 2.

Geissmann, F., Cameron, T.O., Sidobre, S., Manlongat, N., Kronenberg, M., Briskin, M.J., Dustin, M.L., and Littman, D.R. (2005). Intravascular immune surveillance by CXCR6+ NKT cells patrolling liver sinusoids. PLoS Biol. *3*, e113.

Germanov, E., Veinotte, L., Cullen, R., Chamberlain, E., Butcher, E.C., and Johnston, B. (2008). Critical role for the chemokine receptor CXCR6 in homeostasis and activation of CD1d-restricted NKT cells. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *181*, 81–91.

Giaccone, G., Punt, C.J.A., Ando, Y., Ruijter, R., Nishi, N., Peters, M., von Blomberg, B.M.E., Scheper, R.J., van der Vliet, H.J.J., van den Eertwegh, A.J.M., et al. (2002). A phase I study of the natural killer T-cell ligand alpha-galactosylceramide (KRN7000) in patients with solid tumors. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *8*, 3702–3709.

Gillgrass, A., Gill, N., Babian, A., and Ashkar, A.A. (2014). The absence or overexpression of IL-15 drastically alters breast cancer metastasis via effects on NK cells, CD4 T cells, and macrophages. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *193*, 6184–6191.

Girardi, M., Oppenheim, D.E., Steele, C.R., Lewis, J.M., Glusac, E., Filler, R., Hobby, P., Sutton, B., Tigelaar, R.E., and Hayday, A.C. (2001). Regulation of Cutaneous Malignancy by $\gamma\delta$ T Cells. Science *294*, 605–609.

Girardi, M., Glusac, E., Filler, R.B., Roberts, S.J., Propperova, I., Lewis, J., Tigelaar, R.E., and Hayday, A.C. (2003). The Distinct Contributions of Murine T Cell Receptor (TCR) $\gamma\delta$ + and TCR $\alpha\beta$ + T Cells to Different Stages of Chemically Induced Skin Cancer. J. Exp. Med. *198*, 747–755.

van Gisbergen, K.P.J.M., Sanchez-Hernandez, M., Geijtenbeek, T.B.H., and van Kooyk, Y. (2005). Neutrophils mediate immune modulation of dendritic cells through glycosylation-dependent interactions between Mac-1 and DC-SIGN. J. Exp. Med. *201*, 1281–1292.

Goldman, J.M., and Melo, J.V. (2003). Chronic myeloid leukemia--advances in biology and new approaches to treatment. N. Engl. J. Med. *349*, 1451–1464.

Goldman, J.M., Gale, R.P., Horowitz, M.M., Biggs, J.C., Champlin, R.E., Gluckman, E., Hoffmann, R.G., Jacobsen, S.J., Marmont, A.M., and McGlave, P.B. (1988). Bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia in chronic phase. Increased risk for relapse associated with T-cell depletion. Ann. Intern. Med. *108*, 806–814.

Gordon, M.Y., Dowding, C.R., Riley, G.P., Goldman, J.M., and Greaves, M.F. (1987). Altered adhesive interactions with marrow stroma of haematopoietic progenitor cells in chronic myeloid leukaemia. Nature *328*, 342–344.

Gordon, S.M., Carty, S.A., Kim, J.S., Zou, T., Smith-Garvin, J., Alonzo, E.S., Haimm, E., Sant'Angelo, D.B., Koretzky, G.A., Reiner, S.L., et al. (2011). Requirements for eomesodermin and promyelocytic leukemia zinc finger in the development of innate-like CD8+ T cells. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *186*, 4573–4578.

Gorre, M.E., Mohammed, M., Ellwood, K., Hsu, N., Paquette, R., Rao, P.N., and Sawyers, C.L. (2001). Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. Science *293*, 876–880.

Grant, E.P., Beckman, E.M., Behar, S.M., Degano, M., Frederique, D., Besra, G.S., Wilson, I.A., Porcelli, S.A., Furlong, S.T., and Brenner, M.B. (2002). Fine specificity of TCR complementarity-determining region residues and lipid antigen hydrophilic moieties in the recognition of a CD1-lipid complex. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *168*, 3933–3940.

Griewank, K., Borowski, C., Rietdijk, S., Wang, N., Julien, A., Wei, D.G., Mamchak, A.A., Terhorst, C., and Bendelac, A. (2007). Homotypic interactions mediated by Slamf1 and Slamf6 receptors control NKT cell lineage development. Immunity *27*, 751–762.

Gubin, M.M., Zhang, X., Schuster, H., Caron, E., Ward, J.P., Noguchi, T., Ivanova, Y., Hundal, J., Arthur, C.D., Krebber, W.-J., et al. (2014). Checkpoint blockade cancer immunotherapy targets tumour-specific mutant antigens. Nature *515*, 577–581.

Guilhot, F., Roy, L., Saulnier, P.-J., Guilhot, J., Barra, A., Gombert, J.-M., and Turhan, A. (2008). Immunotherapeutic approaches in chronic myelogenous leukemia. Leuk. Lymphoma *49*, 629–634.

Gumperz, J.E., Roy, C., Makowska, A., Lum, D., Sugita, M., Podrebarac, T., Koezuka, Y., Porcelli, S.A., Cardell, S., Brenner, M.B., et al. (2000). Murine CD1d-restricted T cell recognition of cellular lipids. Immunity *12*, 211–221.

Gumperz, J.E., Miyake, S., Yamamura, T., and Brenner, M.B. (2002). Functionally Distinct Subsets of CD1d-restricted Natural Killer T Cells Revealed by CD1d Tetramer Staining. J. Exp. Med. *195*, 625–636.

Guo, W., Dong, A., Xing, C., Lin, X., Pan, X., Lin, Y., Zhu, B., He, M., and Yao, R.-X. (2014). CD1d levels in peripheral blood of patients with acute myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia. Oncol. Lett. *8*, 825–830.

Haluszczak, C., Akue, A.D., Hamilton, S.E., Johnson, L.D.S., Pujanauski, L., Teodorovic, L., Jameson, S.C., and Kedl, R.M. (2009). The antigen-specific CD8+ T cell repertoire in unimmunized mice includes memory phenotype cells bearing markers of homeostatic expansion. J. Exp. Med. *206*, 435–448.

Hantschel, O., and Superti-Furga, G. (2004). Regulation of the c-Abl and Bcr–Abl tyrosine kinases. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *5*, 33–44.

Harnois, T., Constantin, B., Rioux, A., Grenioux, E., Kitzis, A., and Bourmeyster, N. (2003a). Differential interaction and activation of Rho family GTPases by p210bcr-abl and p190bcr-abl. Oncogene *22*, 6445–6454.

Harnois, T., Constantin, B., Rioux, A., Grenioux, E., Kitzis, A., and Bourmeyster, N. (2003b). Differential interaction and activation of Rho family GTPases by p210bcr-abl and p190bcr-abl. Oncogene *22*, 6445–6454.

Hashimoto, W., Takeda, K., Anzai, R., Ogasawara, K., Sakihara, H., Sugiura, K., Seki, S., and Kumagai, K. (1995). Cytotoxic NK1.1 Ag+ alpha beta T cells with intermediate TCR induced in the liver of mice by IL-12. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *154*, 4333–4340.

Hayakawa, Y., Takeda, K., Yagita, H., Kakuta, S., Iwakura, Y., Van Kaer, L., Saiki, I., and Okumura, K. (2001). Critical contribution of IFN-gamma and NK cells, but not perforinmediated cytotoxicity, to anti-metastatic effect of alpha-galactosylceramide. Eur. J. Immunol. *31*, 1720–1727.

Hayashi, T., Imai, K., Morishita, Y., Hayashi, I., Kusunoki, Y., and Nakachi, K. (2006). Identification of the NKG2D haplotypes associated with natural cytotoxic activity of peripheral blood lymphocytes and cancer immunosurveillance. Cancer Res. *66*, 563–570.

Hazlehurst, L.A., Bewry, N.N., Nair, R.R., and Pinilla-Ibarz, J. (2009). Signaling networks associated with BCR-ABL-dependent transformation. Cancer Control J. Moffitt Cancer Cent. *16*, 100–107.

Heil, F., Ahmad-Nejad, P., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Gellert, T., Dietrich, H., Lipford, G., Takeda, K., Akira, S., et al. (2003). The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily. Eur. J. Immunol. *33*, 2987–2997.

Heinzinger, M., Waller, C.F., von den Berg, A., Rosenstiel, A., and Lange, W. (1999). Generation of dendritic cells from patients with chronic myelogenous leukemia. Ann. Hematol. 78, 181–186.

Held, S.A.E., Duchardt, K.M., Tenzer, S., Rückrich, T., von Schwarzenberg, K., Bringmann, A., Kurts, C., Schild, H., Driessen, C., Brossart, P., et al. (2013). Imatinib mesylate and nilotinib affect MHC-class I presentation by modulating the proteasomal processing of antigenic peptides. Cancer Immunol. Immunother. CII *62*, 715–726.

Hemmi, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yamamoto, M., Kaisho, T., Sanjo, H., Kawai, T., Hoshino, K., Takeda, K., and Akira, S. (2004). The roles of two IkappaB kinase-related kinases in lipopolysaccharide and double stranded RNA signaling and viral infection. J. Exp. Med. *199*, 1641–1650.

Hix, L.M., Shi, Y.H., Brutkiewicz, R.R., Stein, P.L., Wang, C.-R., and Zhang, M. (2011). CD1d-expressing breast cancer cells modulate NKT cell-mediated antitumor immunity in a murine model of breast cancer metastasis. PloS One *6*, e20702.

Hochhaus, A., Kreil, S., Corbin, A.S., La Rosée, P., Müller, M.C., Lahaye, T., Hanfstein, B., Schoch, C., Cross, N.C.P., Berger, U., et al. (2002). Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy. Leukemia *16*, 2190–2196.

Hodge, S., Hodge, G., Flower, R., and Han, P. (2000). Surface and intracellular interleukin-2 receptor expression on various resting and activated populations involved in cell-mediated immunity in human peripheral blood. Scand. J. Immunol. *51*, 67–72.

Hoption Cann, S.A., van Netten, J.P., and van Netten, C. (2003). Dr William Coley and tumour regression: a place in history or in the future. Postgrad. Med. J. 79, 672–680.

Horita, M., Andreu, E.J., Benito, A., Arbona, C., Sanz, C., Benet, I., Prosper, F., and Fernandez-Luna, J.L. (2000). Blockade of the Bcr-Abl kinase activity induces apoptosis of chronic myelogenous leukemia cells by suppressing signal transducer and activator of transcription 5-dependent expression of Bcl-xL. J. Exp. Med. *191*, 977–984.

Horowitz, M.M., Gale, R.P., Sondel, P.M., Goldman, J.M., Kersey, J., Kolb, H.J., Rimm, A.A., Ringdén, O., Rozman, C., and Speck, B. (1990). Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. Blood 75, 555–562.

Hu, J., Sahu, N., Walsh, E., and August, A. (2007). Memory phenotype CD8+ T cells with innate function selectively develop in the absence of active Itk. Eur. J. Immunol. *37*, 2892–2899.

Huang, W., Huang, F., Kannan, A.K., Hu, J., and August, A. (2014). ITK tunes IL-4-induced development of innate memory CD8+ T cells in a $\gamma\delta$ T and invariant NKT cell-independent manner. J. Leukoc. Biol. *96*, 55–63.

Hughes, T., Deininger, M., Hochhaus, A., Branford, S., Radich, J., Kaeda, J., Baccarani, M., Cortes, J., Cross, N.C.P., Druker, B.J., et al. (2006). Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. Blood *108*, 28–37.

Ishikawa, A., Motohashi, S., Ishikawa, E., Fuchida, H., Higashino, K., Otsuji, M., Iizasa, T., Nakayama, T., Taniguchi, M., and Fujisawa, T. (2005). A phase I study of alpha-galactosylceramide (KRN7000)-pulsed dendritic cells in patients with advanced and recurrent non-small cell lung cancer. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *11*, 1910–1917.

Jabbour, E. (2016). Chronic myeloid leukemia: First-line drug of choice. Am. J. Hematol. *91*, 59–66.

Jabbour, E., and Kantarjian, H. (2016). Chronic myeloid leukemia: 2016 update on diagnosis, therapy, and monitoring. Am. J. Hematol. *91*, 252–265.

Jacomet, F., Cayssials, E., Basbous, S., Levescot, A., Piccirilli, N., Desmier, D., Robin, A., Barra, A., Giraud, C., Guilhot, F., et al. (2015). Evidence for eomesodermin-expressing innate-like CD8(+) KIR/NKG2A(+) T cells in human adults and cord blood samples. Eur. J. Immunol. *45*, 1926–1933.

Jayawardena-Wolf, J., Benlagha, K., Chiu, Y.H., Mehr, R., and Bendelac, A. (2001). CD1d endosomal trafficking is independently regulated by an intrinsic CD1d-encoded tyrosine motif and by the invariant chain. Immunity *15*, 897–908.

Jiang, W., Swiggard, W.J., Heufler, C., Peng, M., Mirza, A., Steinman, R.M., and Nussenzweig, M.C. (1995). The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. Nature *375*, 151–155.

Johnston, R.J., Comps-Agrar, L., Hackney, J., Yu, X., Huseni, M., Yang, Y., Park, S., Javinal, V., Chiu, H., Irving, B., et al. (2014). The immunoreceptor TIGIT regulates antitumor and antiviral CD8(+) T cell effector function. Cancer Cell *26*, 923–937.

Kain, L., Webb, B., Anderson, B.L., Deng, S., Holt, M., Costanzo, A., Constanzo, A., Zhao, M., Self, K., Teyton, A., et al. (2014). The identification of the endogenous ligands of natural killer T cells reveals the presence of mammalian α -linked glycosylceramides. Immunity *41*, 543–554.

Kain, L., Costanzo, A., Webb, B., Holt, M., Bendelac, A., Savage, P.B., and Teyton, L. (2015). Endogenous ligands of natural killer T cells are alpha-linked glycosylceramides. Mol. Immunol. *68*, 94–97.

Kang, S.-J., and Cresswell, P. (2002). Regulation of intracellular trafficking of human CD1d by association with MHC class II molecules. EMBO J. 21, 1650–1660.

Kapsenberg, M.L. (2003). Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. Nat. Rev. Immunol. *3*, 984–993.

Kärre, K. (2002). Immunology. A perfect mismatch. Science 295, 2029–2031.

Kawano, T., Cui, J., Koezuka, Y., Toura, I., Kaneko, Y., Sato, H., Kondo, E., Harada, M., Koseki, H., Nakayama, T., et al. (1998). Natural killer-like nonspecific tumor cell lysis mediated by specific ligand-activated Valpha14 NKT cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95, 5690–5693.

Kim, E.Y., Lynch, L., Brennan, P.J., Cohen, N.R., and Brenner, M.B. (2015). The transcriptional programs of iNKT cells. Semin. Immunol. *27*, 26–32.

King, I.L., Fortier, A., Tighe, M., Dibble, J., Watts, G.F.M., Veerapen, N., Haberman, A.M., Besra, G.S., Mohrs, M., Brenner, M.B., et al. (2012). Invariant natural killer T cells direct B cell responses to cognate lipid antigen in an IL-21-dependent manner. Nat. Immunol. *13*, 44–50.

Kircher, B., Schumacher, P., Petzer, A., Hoflehner, E., Haun, M., Wolf, A.M., Nachbaur, D., and Gastl, G. (2009). Anti-leukemic activity of valproic acid and imatinib mesylate on human Ph+ ALL and CML cells in vitro. Eur. J. Haematol. *83*, 48–56.

Kobayashi, E., Motoki, K., Uchida, T., Fukushima, H., and Koezuka, Y. (1995). KRN7000, a novel immunomodulator, and its antitumor activities. Oncol. Res. *7*, 529–534.

Koch, M., Stronge, V.S., Shepherd, D., Gadola, S.D., Mathew, B., Ritter, G., Fersht, A.R., Besra, G.S., Schmidt, R.R., Jones, E.Y., et al. (2005). The crystal structure of human CD1d with and without alpha-galactosylceramide. Nat. Immunol. *6*, 819–826.

Koebel, C.M., Vermi, W., Swann, J.B., Zerafa, N., Rodig, S.J., Old, L.J., Smyth, M.J., and Schreiber, R.D. (2007). Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. Nature *450*, 903–907.

Kolb, H.J., Mittermüller, J., Clemm, C., Holler, E., Ledderose, G., Brehm, G., Heim, M., and Wilmanns, W. (1990). Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. Blood *76*, 2462–2465.

Kreutzman, A., Rohon, P., Faber, E., Indrak, K., Juvonen, V., Kairisto, V., Voglová, J., Sinisalo, M., Flochová, E., Vakkila, J., et al. (2011). Chronic myeloid leukemia patients in

prolonged remission following interferon- α monotherapy have distinct cytokine and oligoclonal lymphocyte profile. PloS One *6*, e23022.

Kreutzman, A., Ilander, M., Porkka, K., Vakkila, J., and Mustjoki, S. (2014). Dasatinib promotes Th1-type responses in granzyme B expressing T-cells. Oncoimmunology *3*, e28925.

Kuylenstierna, C., Björkström, N.K., Andersson, S.K., Sahlström, P., Bosnjak, L., Paquin-Proulx, D., Malmberg, K.-J., Ljunggren, H.-G., Moll, M., and Sandberg, J.K. (2011). NKG2D performs two functions in invariant NKT cells: direct TCR-independent activation of NK-like cytolysis and co-stimulation of activation by CD1d. Eur. J. Immunol. *41*, 1913–1923.

Kvistborg, P., Philips, D., Kelderman, S., Hageman, L., Ottensmeier, C., Joseph-Pietras, D., Welters, M.J.P., van der Burg, S., Kapiteijn, E., Michielin, O., et al. (2014). Anti-CTLA-4 therapy broadens the melanoma-reactive CD8+ T cell response. Sci. Transl. Med. *6*, 254ra128.

Lantz, O., and Bendelac, A. (1994). An invariant T cell receptor alpha chain is used by a unique subset of major histocompatibility complex class I-specific CD4+ and CD4-8- T cells in mice and humans. J. Exp. Med. *180*, 1097–1106.

Latour, S. (2007). Natural killer T cells and X-linked lymphoproliferative syndrome. Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol. *7*, 510–514.

Lawton, A.P., Prigozy, T.I., Brossay, L., Pei, B., Khurana, A., Martin, D., Zhu, T., Späte, K., Ozga, M., Höning, S., et al. (2005). The mouse CD1d cytoplasmic tail mediates CD1d trafficking and antigen presentation by adaptor protein 3-dependent and -independent mechanisms. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *174*, 3179–3186.

Le Mercier, I., Lines, J.L., and Noelle, R.J. (2015). Beyond CTLA-4 and PD-1, the Generation Z of Negative Checkpoint Regulators. Front. Immunol. *6*, 418.

Ledoux, M.-P., and Natarajan-Ame, S. (2013). Leucémie myéloïde chronique : des réponses et des questions. Médecine Thérapeutique *19*, 128–138.

Lee, A., Park, S.P., Park, C.H., Kang, B.H., Park, S.H., Ha, S.-J., and Jung, K.C. (2015). IL-4 Induced Innate CD8+ T Cells Control Persistent Viral Infection. PLoS Pathog. *11*, e1005193.

Lee, P.T., Benlagha, K., Teyton, L., and Bendelac, A. (2002). Distinct Functional Lineages of Human V α 24 Natural Killer T Cells. J. Exp. Med. *195*, 637–641.

Lee, Y.J., Holzapfel, K.L., Zhu, J., Jameson, S.C., and Hogquist, K.A. (2013). Steady-state production of IL-4 modulates immunity in mouse strains and is determined by lineage diversity of iNKT cells. Nat. Immunol. *14*, 1146–1154.

Levitsky, H.I., Golumbek, P.T., and Pardoll, D.M. (1991). The fate of CD4-8- T cell receptoralpha beta+ thymocytes. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *146*, 1113–1117. Liao, X.C., and Littman, D.R. (1995). Altered T cell receptor signaling and disrupted T cell development in mice lacking Itk. Immunity *3*, 757–769.

Liao, J.K., Seto, M., and Noma, K. (2007). Rho kinase (ROCK) inhibitors. J. Cardiovasc. Pharmacol. 50, 17–24.

Liu, K., and Nussenzweig, M.C. (2010). Origin and development of dendritic cells. Immunol. Rev. 234, 45–54.

Lynch, L., Michelet, X., Zhang, S., Brennan, P.J., Moseman, A., Lester, C., Besra, G., Vomhof-Dekrey, E.E., Tighe, M., Koay, H.-F., et al. (2015). Regulatory iNKT cells lack expression of the transcription factor PLZF and control the homeostasis of T(reg) cells and macrophages in adipose tissue. Nat. Immunol. *16*, 85–95.

Makino, Y., Kanno, R., Ito, T., Higashino, K., and Taniguchi, M. (1995). Predominant expression of invariant V alpha 14+ TCR alpha chain in NK1.1+ T cell populations. Int. Immunol. 7, 1157–1161.

Mantovani, A. (2009). Cancer: Inflaming metastasis. Nature 457, 36-37.

Matsuda, J.L., Mallevaey, T., Scott-Browne, J., and Gapin, L. (2008). CD1d-restricted iNKT cells, the "Swiss-Army knife" of the immune system. Curr. Opin. Immunol. *20*, 358–368.

Matsumoto, M., Funami, K., Tanabe, M., Oshiumi, H., Shingai, M., Seto, Y., Yamamoto, A., and Seya, T. (2003). Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *171*, 3154–3162.

Matsushita, H., Vesely, M.D., Koboldt, D.C., Rickert, C.G., Uppaluri, R., Magrini, V.J., Arthur, C.D., White, J.M., Chen, Y.-S., Shea, L.K., et al. (2012). Cancer exome analysis reveals a T-cell-dependent mechanism of cancer immunoediting. Nature *482*, 400–404.

Matsuzaki, J., Gnjatic, S., Mhawech-Fauceglia, P., Beck, A., Miller, A., Tsuji, T., Eppolito, C., Qian, F., Lele, S., Shrikant, P., et al. (2010). Tumor-infiltrating NY-ESO-1-specific CD8+ T cells are negatively regulated by LAG-3 and PD-1 in human ovarian cancer. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *107*, 7875–7880.

Mbitikon-Kobo, F.-M., Vocanson, M., Michallet, M.-C., Tomkowiak, M., Cottalorda, A., Angelov, G.S., Coupet, C.-A., Djebali, S., Marçais, A., Dubois, B., et al. (2009). Characterization of a CD44/CD122int Memory CD8 T Cell Subset Generated under Sterile Inflammatory Conditions. J. Immunol. *182*, 3846–3854.

McCarthy, E.F. (2006). The toxins of William B. Coley and the treatment of bone and soft-tissue sarcomas. Iowa Orthop. J. 26, 154–158.

Melián, A., Watts, G.F.M., Shamshiev, A., Libero, G.D., Clatworthy, A., Vincent, M., Brenner, M.B., Behar, S., Niazi, K., Modlin, R.L., et al. (2000). Molecular Recognition of

Human CD1b Antigen Complexes: Evidence for a Common Pattern of Interaction with $\alpha\beta$ TCRs. J. Immunol. *165*, 4494–4504.

Mellman, I., Coukos, G., and Dranoff, G. (2011). Cancer immunotherapy comes of age. Nature 480, 480–489.

Melo, J.V. (1996). The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. Blood *88*, 2375–2384.

Meseri, A., Delwail, V., Mahon, F.X., Pelletier, D., Guilhot, F., Brizard, A., Gombert, J., Tanzer, J., and Goube de Laforest, P. (1991). Natural-killer cell activity and cytogenetic response in chronic myelogenous leukemia treated with alpha-interferon. Br. J. Haematol. *78*, 585–586.

Min, H.S., Lee, Y.J., Jeon, Y.K., Kim, E.J., Kang, B.H., Jung, K.C., Chang, C.-H., and Park, S.H. (2011). MHC class II-restricted interaction between thymocytes plays an essential role in the production of innate CD8+ T cells. J. Immunol. *186*, 5749–5757.

Mittal, D., Gubin, M.M., Schreiber, R.D., and Smyth, M.J. (2014). New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape. Curr. Opin. Immunol. *27*, 16–25.

Mlecnik, B., Bindea, G., Pagès, F., and Galon, J. (2011). Tumor immunosurveillance in human cancers. Cancer Metastasis Rev. *30*, 5–12.

Mlecnik, B., Bindea, G., Angell, H.K., Sasso, M.S., Obenauf, A.C., Fredriksen, T., Lafontaine, L., Bilocq, A.M., Kirilovsky, A., Tosolini, M., et al. (2014). Functional network pipeline reveals genetic determinants associated with in situ lymphocyte proliferation and survival of cancer patients. Sci. Transl. Med. *6*, 228ra37.

Mohty, M., Jarrossay, D., Lafage-Pochitaloff, M., Zandotti, C., Brière, F., Lamballeri, X.-N. de, Isnardon, D., Sainty, D., Olive, D., and Gaugler, B. (2001). Circulating blood dendritic cells from myeloid leukemia patients display quantitative and cytogenetic abnormalities as well as functional impairment. Blood *98*, 3750–3756.

Mohty, M., Isnardon, D., Vey, N., Brière, F., Blaise, D., Olive, D., and Gaugler, B. (2002). Low blood dendritic cells in chronic myeloid leukaemia patients correlates with loss of CD34+/CD38- primitive haematopoietic progenitors. Br. J. Haematol. *119*, 115–118.

Mohty, M., Jourdan, E., Mami, N.B., Vey, N., Damaj, G., Blaise, D., Isnardon, D., Olive, D., and Gaugler, B. (2004). Imatinib and plasmacytoid dendritic cell function in patients with chronic myeloid leukemia. Blood *103*, 4666–4668.

Molldrem, J., Dermime, S., Parker, K., Jiang, Y.Z., Mavroudis, D., Hensel, N., Fukushima, P., and Barrett, A.J. (1996). Targeted T-cell therapy for human leukemia: cytotoxic T lymphocytes specific for a peptide derived from proteinase 3 preferentially lyse human myeloid leukemia cells. Blood *88*, 2450–2457.

Molldrem, J.J., Clave, E., Jiang, Y.Z., Mavroudis, D., Raptis, A., Hensel, N., Agarwala, V., and Barrett, A.J. (1997). Cytotoxic T lymphocytes specific for a nonpolymorphic proteinase 3 peptide preferentially inhibit chronic myeloid leukemia colony-forming units. Blood *90*, 2529–2534.

Molldrem, J.J., Lee, P.P., Wang, C., Felio, K., Kantarjian, H.M., Champlin, R.E., and Davis, M.M. (2000). Evidence that specific T lymphocytes may participate in the elimination of chronic myelogenous leukemia. Nat. Med. *6*, 1018–1023.

Molling, J.W., Langius, J.A.E., Langendijk, J.A., Leemans, C.R., Bontkes, H.J., van der Vliet, H.J.J., von Blomberg, B.M.E., Scheper, R.J., and van den Eertwegh, A.J.M. (2007). Low levels of circulating invariant natural killer T cells predict poor clinical outcome in patients with head and neck squamous cell carcinoma. J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. *25*, 862–868.

Monteiro, M., Almeida, C.F., Caridade, M., Ribot, J.C., Duarte, J., Agua-Doce, A., Wollenberg, I., Silva-Santos, B., and Graca, L. (2010). Identification of regulatory Foxp3+ invariant NKT cells induced by TGF-beta. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *185*, 2157–2163.

Montoya, C.J., Pollard, D., Martinson, J., Kumari, K., Wasserfall, C., Mulder, C.B., Rugeles, M.T., Atkinson, M.A., Landay, A.L., and Wilson, S.B. (2007). Characterization of human invariant natural killer T subsets in health and disease using a novel invariant natural killer T cell-clonotypic monoclonal antibody, 6B11. Immunology *122*, 1–14.

Moody, D.B., Reinhold, B.B., Guy, M.R., Beckman, E.M., Frederique, D.E., Furlong, S.T., Ye, S., Reinhold, V.N., Sieling, P.A., Modlin, R.L., et al. (1997). Structural requirements for glycolipid antigen recognition by CD1b-restricted T cells. Science *278*, 283–286.

Moody, D.B., Zajonc, D.M., and Wilson, I.A. (2005). Anatomy of CD1-lipid antigen complexes. Nat. Rev. Immunol. 5, 387–399.

Moreira-Teixeira, L., Resende, M., Devergne, O., Herbeuval, J.-P., Hermine, O., Schneider, E., Dy, M., Cordeiro-da-Silva, A., and Leite-de-Moraes, M.C. (2012). Rapamycin Combined with TGF- β Converts Human Invariant NKT Cells into Suppressive Foxp3+ Regulatory Cells. J. Immunol. *188*, 624–631.

Mori, L., Lepore, M., and De Libero, G. (2016). The Immunology of CD1- and MR1-Restricted T Cells. Annu. Rev. Immunol.

Muenst, S., Läubli, H., Soysal, S.D., Zippelius, A., Tzankov, A., and Hoeller, S. (2016). The immune system and cancer evasion strategies: therapeutic concepts. J. Intern. Med.

Müller-Hermelink, N., Braumüller, H., Pichler, B., Wieder, T., Mailhammer, R., Schaak, K., Ghoreschi, K., Yazdi, A., Haubner, R., Sander, C.A., et al. (2008). TNFR1 signaling and IFN-gamma signaling determine whether T cells induce tumor dormancy or promote multistage carcinogenesis. Cancer Cell *13*, 507–518.

Mumprecht, S., Schürch, C., Schwaller, J., Solenthaler, M., and Ochsenbein, A.F. (2009). Programmed death 1 signaling on chronic myeloid leukemia-specific T cells results in T-cell exhaustion and disease progression. Blood *114*, 1528–1536.

Nakagawa, R., Nagafune, I., Tazunoki, Y., Ehara, H., Tomura, H., Iijima, R., Motoki, K., Kamishohara, M., and Seki, S. (2001). Mechanisms of the antimetastatic effect in the liver and of the hepatocyte injury induced by alpha-galactosylceramide in mice. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *166*, 6578–6584.

Natori, T., Morita, M., Akimoto, K., and Koezuka, Y. (1994). Agelasphins, novel antitumor and immunostimulatory cerebrosides from the marine sponge Agelas mauritianus. Tetrahedron *50*, 2771–2784.

Ngiow, S.F., Teng, M.W.L., and Smyth, M.J. (2013). A balance of interleukin-12 and -23 in cancer. Trends Immunol. *34*, 548–555.

O'Dwyer, M.E., Mauro, M.J., and Druker, B.J. (2002). Recent advancements in the treatment of chronic myelogenous leukemia. Annu. Rev. Med. *53*, 369–381.

Olavarria, E. (2007). Autologous stem cell transplantation in chronic myeloid leukemia. Semin. Hematol. 44, 252–258.

O'Reilly, V., Zeng, S.G., Bricard, G., Atzberger, A., Hogan, A.E., Jackson, J., Feighery, C., Porcelli, S.A., and Doherty, D.G. (2011). Distinct and overlapping effector functions of expanded human CD4+, CD8 α + and CD4-CD8 α - invariant natural killer T cells. PloS One *6*, e28648.

Ostrand-Rosenberg, S., and Sinha, P. (2009). Myeloid-Derived Suppressor Cells: Linking Inflammation and Cancer. J. Immunol. *182*, 4499–4506.

O'Sullivan, T., Saddawi-Konefka, R., Vermi, W., Koebel, C.M., Arthur, C., White, J.M., Uppaluri, R., Andrews, D.M., Ngiow, S.F., Teng, M.W.L., et al. (2012). Cancer immunoediting by the innate immune system in the absence of adaptive immunity. J. Exp. Med. *209*, 1869–1882.

Pear, W.S., Miller, J.P., Xu, L., Pui, J.C., Soffer, B., Quackenbush, R.C., Pendergast, A.M., Bronson, R., Aster, J.C., Scott, M.L., et al. (1998). Efficient and rapid induction of a chronic myelogenous leukemia-like myeloproliferative disease in mice receiving P210 bcr/abl-transduced bone marrow. Blood *92*, 3780–3792.

Pear, W.S., Tu, L., and Stein, P.L. (2004). Lineage choices in the developing thymus: choosing the T and NKT pathways. Curr. Opin. Immunol. *16*, 167–173.

Porcelli, S.A., and Brenner, M.B. (1997). Antigen presentation: mixing oil and water. Curr. Biol. CB 7, R508-511.

Porcelli, S., Yockey, C.E., Brenner, M.B., and Balk, S.P. (1993). Analysis of T cell antigen receptor (TCR) expression by human peripheral blood CD4-8- alpha/beta T cells demonstrates preferential use of several V beta genes and an invariant TCR alpha chain. J. Exp. Med. *178*, 1–16.

Prigozy, T.I., Naidenko, O., Qasba, P., Elewaut, D., Brossay, L., Khurana, A., Natori, T., Koezuka, Y., Kulkarni, A., and Kronenberg, M. (2001). Glycolipid antigen processing for presentation by CD1d molecules. Science *291*, 664–667.

Prince, A.L., Kraus, Z., Carty, S.A., Ng, C., Yin, C.C., Jordan, M.S., Schwartzberg, P.L., and Berg, L.J. (2014). Development of Innate CD4+ and CD8+ T Cells in Itk-Deficient Mice Is Regulated by Distinct Pathways. J. Immunol. *193*, 688–699.

Prost, S., Relouzat, F., Spentchian, M., Ouzegdouh, Y., Saliba, J., Massonnet, G., Beressi, J.-P., Verhoeyen, E., Raggueneau, V., Maneglier, B., et al. (2015). Erosion of the chronic myeloid leukaemia stem cell pool by PPARγ agonists. Nature *525*, 380–383.

Pulendran, B., Kumar, P., Cutler, C.W., Mohamadzadeh, M., Van Dyke, T., and Banchereau, J. (2001). Lipopolysaccharides from distinct pathogens induce different classes of immune responses in vivo. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *167*, 5067–5076.

Raftopoulou, M., and Hall, A. (2004). Cell migration: Rho GTPases lead the way. Dev. Biol. *265*, 23–32.

Ren, R. (2005). Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. Nat. Rev. Cancer 5, 172–183.

Renkema, K.R., Lee, J.-Y., Lee, Y.J., Hamilton, S.E., Hogquist, K.A., and Jameson, S.C. (2016). IL-4 sensitivity shapes the peripheral CD8+ T cell pool and response to infection. J. Exp. Med.

Renukaradhya, G.J., Sriram, V., Du, W., Gervay-Hague, J., Van Kaer, L., and Brutkiewicz, R.R. (2006). Inhibition of antitumor immunity by invariant natural killer T cells in a T-cell lymphoma model in vivo. Int. J. Cancer *118*, 3045–3053.

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

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

van Rhee, F., Szydlo, R.M., Hermans, J., Devergie, A., Frassoni, F., Arcese, W., de Witte, T., Kolb, H.J., Niederwiser, D., Jacobsen, N., et al. (1997). Long-term results after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia in chronic phase: a report from the Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. Bone Marrow Transplant. *20*, 553–560.

Ridley, A.J. (2006). Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. Trends Cell Biol. *16*, 522–529.

Riether, C., Gschwend, T., Huguenin, A.-L., Schürch, C.M., and Ochsenbein, A.F. (2015). Blocking programmed cell death 1 in combination with adoptive cytotoxic T-cell transfer eradicates chronic myelogenous leukemia stem cells. Leukemia *29*, 1781–1785.

Rizvi, N.A., Hellmann, M.D., Snyder, A., Kvistborg, P., Makarov, V., Havel, J.J., Lee, W., Yuan, J., Wong, P., Ho, T.S., et al. (2015). Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. Science *348*, 124–128.

Roark, J.H., Park, S.H., Jayawardena, J., Kavita, U., Shannon, M., and Bendelac, A. (1998). CD1.1 expression by mouse antigen-presenting cells and marginal zone B cells. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *160*, 3121–3127.

Rochelle, T., Daubon, T., Troys, M.V., Harnois, T., Waterschoot, D., Ampe, C., Roy, L., Bourmeyster, N., and Constantin, B. (2013). p210bcr-abl induces amoeboid motility by recruiting ADF/destrin through RhoA/ROCK1. FASEB J. *27*, 123–134.

Rodionov, D.G., Nordeng, T.W., Pedersen, K., Balk, S.P., and Bakke, O. (1999). A Critical Tyrosine Residue in the Cytoplasmic Tail Is Important for CD1d Internalization But Not for Its Basolateral Sorting in MDCK Cells. J. Immunol. *162*, 1488–1495.

Rojas, J.M., Knight, K., Wang, L., and Clark, R.E. (2007). Clinical evaluation of BCR-ABL peptide immunisation in chronic myeloid leukaemia: results of the EPIC study. Leukemia *21*, 2287–2295.

Rossignol, A., Levescot, A., Jacomet, F., Robin, A., Basbous, S., Giraud, C., Roy, L., Guilhot, F., Turhan, A.G., Barra, A., et al. (2012). Evidence for BCR-ABL-dependent dysfunctions of iNKT cells from chronic myeloid leukemia patients. Eur. J. Immunol. *42*, 1870–1875.

Rudd, B.D., Venturi, V., Li, G., Samadder, P., Ertelt, J.M., Way, S.S., Davenport, M.P., and Nikolich-Zugich, J. (2011a). Nonrandom attrition of the naive CD8+ T-cell pool with aging governed by T-cell receptor:pMHC interactions. Proc. Natl. Acad. Sci. *108*, 13694–13699.

Rudd, B.D., Venturi, V., Davenport, M.P., and Nikolich-Žugich, J. (2011b). Evolution of the Antigen-Specific CD8+ TCR Repertoire across the Life Span: Evidence for Clonal Homogenization of the Old TCR Repertoire. J. Immunol. *186*, 2056–2064.

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

Russell, J.H., and Ley, T.J. (2002). Lymphocyte-mediated cytotoxicity. Annu. Rev. Immunol. 20, 323–370.

Sag, D., Krause, P., Hedrick, C.C., Kronenberg, M., and Wingender, G. (2014). IL-10producing NKT10 cells are a distinct regulatory invariant NKT cell subset. J. Clin. Invest. *124*, 3725–3740.

Sahay, S., Pannucci, N.L., Mahon, G.M., Rodriguez, P.L., Megjugorac, N.J., Kostenko, E.V., Ozer, H.L., and Whitehead, I.P. (2008). The RhoGEF domain of p210 Bcr-Abl activates RhoA and is required for transformation. Oncogene *27*, 2064–2071.

Sakuishi, K., Apetoh, L., Sullivan, J.M., Blazar, B.R., Kuchroo, V.K., and Anderson, A.C. (2010). Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. J. Exp. Med. *207*, 2187–2194.

Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C., and Lanzavecchia, A. (1995). Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. J. Exp. Med. *182*, 389–400.

Savage, A.K., Constantinides, M.G., Han, J., Picard, D., Martin, E., Li, B., Lantz, O., and Bendelac, A. (2008). The Transcription Factor PLZF Directs the Effector Program of the NKT Cell Lineage. Immunity *29*, 391–403.

Schreiber, R.D., Old, L.J., and Smyth, M.J. (2011). Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. Science *331*, 1565–1570.

Schürch, C., Riether, C., Amrein, M.A., and Ochsenbein, A.F. (2013). Cytotoxic T cells induce proliferation of chronic myeloid leukemia stem cells by secreting interferon- γ . J. Exp. Med. *210*, 605–621.

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

Shimizu, K., Hidaka, M., Kadowaki, N., Makita, N., Konishi, N., Fujimoto, K., Uchiyama, T., Kawano, F., Taniguchi, M., and Fujii, S. (2006). Evaluation of the function of human invariant NKT cells from cancer patients using alpha-galactosylceramide-loaded murine dendritic cells. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *177*, 3484–3492.

Shimokawa, H., Hiramori, K., Iinuma, H., Hosoda, S., Kishida, H., Osada, H., Katagiri, T., Yamauchi, K., Yui, Y., Minamino, T., et al. (2002). Anti-anginal effect of fasudil, a Rho-

kinase inhibitor, in patients with stable effort angina: a multicenter study. J. Cardiovasc. Pharmacol. 40, 751–761.

Shin, T., Nakayama, T., Akutsu, Y., Motohashi, S., Shibata, Y., Harada, M., Kamada, N., Shimizu, C., Shimizu, E., Saito, T., et al. (2001). Inhibition of tumor metastasis by adoptive transfer of IL-12-activated Valpha14 NKT cells. Int. J. Cancer *91*, 523–528.

Sirvent, A., Benistant, C., and Roche, S. (2008). Cytoplasmic signalling by the c-Abl tyrosine kinase in normal and cancer cells. Biol. Cell *100*, 617–631.

Smith, K.M., Yacobi, R., and Van Etten, R.A. (2003). Autoinhibition of Bcr-Abl through Its SH3 Domain. Mol. Cell *12*, 27–37.

Smyth, M.J., Thia, K.Y., Street, S.E., Cretney, E., Trapani, J.A., Taniguchi, M., Kawano, T., Pelikan, S.B., Crowe, N.Y., and Godfrey, D.I. (2000). Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. J. Exp. Med. *191*, 661–668.

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

Smyth, M.J., Swann, J., Cretney, E., Zerafa, N., Yokoyama, W.M., and Hayakawa, Y. (2005). NKG2D function protects the host from tumor initiation. J. Exp. Med. *202*, 583–588.

Smyth, M.J., Dunn, G.P., and Schreiber, R.D. (2006). Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. Adv. Immunol. *90*, 1–50.

Song, L., Asgharzadeh, S., Salo, J., Engell, K., Wu, H., Sposto, R., Ara, T., Silverman, A.M., DeClerck, Y.A., Seeger, R.C., et al. (2009). Valpha24-invariant NKT cells mediate antitumor activity via killing of tumor-associated macrophages. J. Clin. Invest. *119*, 1524–1536.

Sosinowski, T., White, J.T., Cross, E., Haluszczak, C., Marrack, P., Gapin, L., and Kedl, R.M. (2013). CD8 α + DC trans-presentation of IL-15 to naïve CD8+ T cells produces antigen inexperienced T cells in the periphery with memory phenotype and function. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *190*, 1936–1947.

Sozzani, S. (2005). Dendritic cell trafficking: more than just chemokines. Cytokine Growth Factor Rev. *16*, 581–592.

Spanoudakis, E., Hu, M., Naresh, K., Terpos, E., Melo, V., Reid, A., Kotsianidis, I., Abdalla, S., Rahemtulla, A., and Karadimitris, A. (2009). Regulation of multiple myeloma survival and progression by CD1d. Blood *113*, 2498–2507.

Spranger, S., and Gajewski, T. (2013). Rational combinations of immunotherapeutics that target discrete pathways. J. Immunother. Cancer *1*, 16.

Steelman, L.S., Pohnert, S.C., Shelton, J.G., Franklin, R.A., Bertrand, F.E., and McCubrey, J.A. (2004). JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. Leukemia *18*, 189–218.

Steinman, R.M. (2003). The control of immunity and tolerance by dendritic cell. Pathol. Biol. (Paris) *51*, 59–60.

Stern, M., de Wreede, L.C., Brand, R., van Biezen, A., Dreger, P., Mohty, M., de Witte, T.M., Kröger, N., and Ruutu, T. (2014). Sensitivity of hematological malignancies to graft-versus-host effects: an EBMT megafile analysis. Leukemia *28*, 2235–2240.

Street, S.E., Cretney, E., and Smyth, M.J. (2001). Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. Blood *97*, 192–197.

Street, S.E.A., Hayakawa, Y., Zhan, Y., Lew, A.M., MacGregor, D., Jamieson, A.M., Diefenbach, A., Yagita, H., Godfrey, D.I., and Smyth, M.J. (2004). Innate immune surveillance of spontaneous B cell lymphomas by natural killer cells and gammadelta T cells. J. Exp. Med. *199*, 879–884.

Sugita, M., Cao, X., Watts, G.F.M., Rogers, R.A., Bonifacino, J.S., and Brenner, M.B. (2002). Failure of trafficking and antigen presentation by CD1 in AP-3-deficient cells. Immunity *16*, 697–706.

Sykes, M. (1990). Unusual T cell populations in adult murine bone marrow. Prevalence of CD3+CD4-CD8- and alpha beta TCR+NK1.1+ cells. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *145*, 3209–3215.

Szatmari, I., Gogolak, P., Im, J.S., Dezso, B., Rajnavolgyi, E., and Nagy, L. (2004). Activation of PPARgamma specifies a dendritic cell subtype capable of enhanced induction of iNKT cell expansion. Immunity *21*, 95–106.

Tachibana, T., Onodera, H., Tsuruyama, T., Mori, A., Nagayama, S., Hiai, H., and Imamura, M. (2005). Increased intratumor Valpha24-positive natural killer T cells: a prognostic factor for primary colorectal carcinomas. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *11*, 7322–7327.

Tahir, S.M., Cheng, O., Shaulov, A., Koezuka, Y., Bubley, G.J., Wilson, S.B., Balk, S.P., and Exley, M.A. (2001). Loss of IFN-gamma production by invariant NK T cells in advanced cancer. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *167*, 4046–4050.

Takahashi, T., Chiba, S., Nieda, M., Azuma, T., Ishihara, S., Shibata, Y., Juji, T., and Hirai, H. (2002). Cutting edge: analysis of human V alpha 24+CD8+ NK T cells activated by alpha-galactosylceramide-pulsed monocyte-derived dendritic cells. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *168*, 3140–3144.

Takeda, K., Seki, S., Ogasawara, K., Anzai, R., Hashimoto, W., Sugiura, K., Takahashi, M., Satoh, M., and Kumagai, K. (1996). Liver NK1.1+ CD4+ alpha beta T cells activated by IL-

12 as a major effector in inhibition of experimental tumor metastasis. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *156*, 3366–3373.

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

Tala, I., Chen, R., Hu, T., Fitzpatrick, E.R., Williams, D.A., and Whitehead, I.P. (2013). Contributions of the RhoGEF activity of p210 BCR/ABL to disease progression. Leukemia *27*, 1080–1089.

Tan, M.C., Mommaas, A.M., Drijfhout, J.W., Jordens, R., Onderwater, J.J., Verwoerd, D., Mulder, A.A., van der Heiden, A.N., Scheidegger, D., Oomen, L.C., et al. (1997). Mannose receptor-mediated uptake of antigens strongly enhances HLA class II-restricted antigen presentation by cultured dendritic cells. Eur. J. Immunol. *27*, 2426–2435.

Terme, M., Borg, C., Guilhot, F., Masurier, C., Flament, C., Wagner, E.F., Caillat-Zucman, S., Bernheim, A., Turhan, A.G., Caignard, A., et al. (2005). BCR/ABL promotes dendritic cell-mediated natural killer cell activation. Cancer Res. *65*, 6409–6417.

Thomas, E.K., Cancelas, J.A., Zheng, Y., and Williams, D.A. (2008). Rac GTPases as key regulators of p210-BCR-ABL-dependent leukemogenesis. Leukemia *22*, 898–904.

Tourne, S., Maitre, B., Collmann, A., Layre, E., Mariotti, S., Signorino-Gelo, F., Loch, C., Salamero, J., Gilleron, M., Angénieux, C., et al. (2008). Cutting edge: a naturally occurring mutation in CD1e impairs lipid antigen presentation. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *180*, 3642–3646.

Trombetta, E.S., and Mellman, I. (2005). Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. Annu. Rev. Immunol. *23*, 975–1028.

Turhan, A. (2002). Biologie de la protéine de fusion BCR-ABL : progrès récents. Hématologie 8, 35-45.

Ueno, H., Klechevsky, E., Morita, R., Aspord, C., Cao, T., Matsui, T., Di Pucchio, T., Connolly, J., Fay, J.W., Pascual, V., et al. (2007). Dendritic cell subsets in health and disease. Immunol. Rev. *219*, 118–142.

Veneri, D., Tecchio, C., De Matteis, G., Paviati, E., Benati, M., Franchini, M., and Pizzolo, G. (2012). Long-term persistence of molecular response after discontinuation of interferon-alpha in two patients with chronic myeloid leukaemia. Blood Transfus. *10*, 233–234.

Ventre, E., Brinza, L., Schicklin, S., Mafille, J., Coupet, C.-A., Marçais, A., Djebali, S., Jubin, V., Walzer, T., and Marvel, J. (2012). Negative Regulation of NKG2D Expression by IL-4 in Memory CD8 T Cells. J. Immunol. *189*, 3480–3489.

Verykokakis, M., Boos, M.D., Bendelac, A., and Kee, B.L. (2010). SAP protein-dependent natural killer T-like cells regulate the development of CD8(+) T cells with innate lymphocyte characteristics. Immunity *33*, 203–215.

Vessella, R.L., Pantel, K., and Mohla, S. (2007). Tumor cell dormancy: an NCI workshop report. Cancer Biol. Ther. *6*, 1496–1504.

Wallace, K.L., Marshall, M.A., Ramos, S.I., Lannigan, J.A., Field, J.J., Strieter, R.M., and Linden, J. (2009). NKT cells mediate pulmonary inflammation and dysfunction in murine sickle cell disease through production of IFN-gamma and CXCR3 chemokines. Blood *114*, 667–676.

Wang, C., Al-Omar, H.M., Radvanyi, L., Banerjee, A., Bouman, D., Squire, J., and Messner, H.A. (1999). Clonal heterogeneity of dendritic cells derived from patients with chronic myeloid leukemia and enhancement of their T-cells stimulatory activity by IFN-alpha. Exp. Hematol. *27*, 1176–1184.

Wang, Y., Huang, G., Vogel, P., Neale, G., Reizis, B., and Chi, H. (2012). Transforming growth factor beta-activated kinase 1 (TAK1)-dependent checkpoint in the survival of dendritic cells promotes immune homeostasis and function. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *109*, E343-352.

Warren, H.S., Rana, P.M., Rieger, D.T., Hewitt, K.A., Dahlstrom, J.E., and Kent, A.L. (2006). CD8 T cells expressing killer Ig-like receptors and NKG2A are present in cord blood and express a more naïve phenotype than their counterparts in adult blood. J. Leukoc. Biol. *79*, 1252–1259.

Watarai, H., Sekine-Kondo, E., Shigeura, T., Motomura, Y., Yasuda, T., Satoh, R., Yoshida, H., Kubo, M., Kawamoto, H., Koseki, H., et al. (2012). Development and function of invariant natural killer T cells producing T(h)2- and T(h)17-cytokines. PLoS Biol. *10*, e1001255.

Watowich, S.S., and Liu, Y.-J. (2010). Mechanisms regulating dendritic cell specification and development. Immunol. Rev. 238, 76–92.

Weinkove, R., Brooks, C.R., Carter, J.M., Hermans, I.F., and Ronchese, F. (2013). Functional invariant natural killer T-cell and CD1d axis in chronic lymphocytic leukemia: implications for immunotherapy. Haematologica *98*, 376–384.

Weinreich, M.A., Odumade, O.A., Jameson, S.C., and Hogquist, K.A. (2010). T cells expressing the transcription factor PLZF regulate the development of memory-like CD8+ T cells. Nat. Immunol. *11*, 709–716.

Wen, X., Rao, P., Carreño, L.J., Kim, S., Lawrenczyk, A., Porcelli, S.A., Cresswell, P., and Yuan, W. (2013). Human CD1d knock-in mouse model demonstrates potent antitumor potential of human CD1d-restricted invariant natural killer T cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *110*, 2963–2968.

Wen, X., Kim, S., Xiong, R., Li, M., Lawrenczyk, A., Huang, X., Chen, S.-Y., Rao, P., Besra, G.S., Dellabona, P., et al. (2015). A Subset of CD8 $\alpha\beta$ + Invariant NKT Cells in a Humanized Mouse Model. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *195*, 1459–1469.

White, D.L., Saunders, V.A., Dang, P., Engler, J., Venables, A., Zrim, S., Zannettino, A., Lynch, K., Manley, P.W., and Hughes, T. (2007). Most CML patients who have a suboptimal response to imatinib have low OCT-1 activity: higher doses of imatinib may overcome the negative impact of low OCT-1 activity. Blood *110*, 4064–4072.

Wilson, N.S., and Villadangos, J.A. (2005). Regulation of Antigen Presentation and Cross-Presentation in the Dendritic Cell Network: Facts, Hypothesis, and Immunological Implications. In Advances in Immunology, F.W. Alt, ed. (Academic Press), pp. 241–305.

Winzler, C., Rovere, P., Rescigno, M., Granucci, F., Penna, G., Adorini, L., Zimmermann, V.S., Davoust, J., and Ricciardi-Castagnoli, P. (1997). Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures. J. Exp. Med. *185*, 317–328.

Wong, S., and Witte, O.N. (2004). The BCR-ABL story: bench to bedside and back. Annu. Rev. Immunol. 22, 247–306.

Woo, S.-R., Turnis, M.E., Goldberg, M.V., Bankoti, J., Selby, M., Nirschl, C.J., Bettini, M.L., Gravano, D.M., Vogel, P., Liu, C.L., et al. (2012). Immune inhibitory molecules LAG-3 and PD-1 synergistically regulate T-cell function to promote tumoral immune escape. Cancer Res. *72*, 917–927.

Wu, C.J., Yang, X.F., McLaughlin, S., Neuberg, D., Canning, C., Stein, B., Alyea, E.P., Soiffer, R.J., Dranoff, G., and Ritz, J. (2000). Detection of a potent humoral response associated with immune-induced remission of chronic myelogenous leukemia. J. Clin. Invest. *106*, 705–714.

Yao, V., Platell, C., and Hall, J.C. (2002). Dendritic cells. ANZ J. Surg. 72, 501-506.

Yoneda, K., Morii, T., Nieda, M., Tsukaguchi, N., Amano, I., Tanaka, H., Yagi, H., Narita, N., and Kimura, H. (2005). The peripheral blood V α 24+NKT cell numbers decrease in patients with haematopoietic malignancy. Leuk. Res. 29, 147–152.

Zajonc, D.M., Cantu, C., Mattner, J., Zhou, D., Savage, P.B., Bendelac, A., Wilson, I.A., and Teyton, L. (2005). Structure and function of a potent agonist for the semi-invariant natural killer T cell receptor. Nat. Immunol. *6*, 810–818.

Zeng, Z., Castaño, A.R., Segelke, B.W., Stura, E.A., Peterson, P.A., and Wilson, I.A. (1997). Crystal structure of mouse CD1: An MHC-like fold with a large hydrophobic binding groove. Science 277, 339–345.

Zhou, X., Yu, S., Zhao, D.-M., Harty, J.T., Badovinac, V.P., and Xue, H.-H. (2010). Differentiation and persistence of memory CD8+ T cells depend on T cell factor 1. Immunity *33*, 229–240.

Annexe

AACER American Association for Cancer Research

٦



The Journal of Cancer Research (1916-1930) | The American Journal of Cancer (1931-1940)

BCR-ABL-Induced Deregulation of the IL-33/ST2 Pathway in CD34(+) Progenitors from Chronic Myeloid Leukemia Patients

Anaïs Levescot, Stéphane Flamant, Sara Basbous, et al.

Cancer Res 2014;74:2669-2676. Published OnlineFirst March 27, 2014.

Updated version	Access the most recent version of this article at: doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-2797
Supplementary	Access the most recent supplemental material at:
Material	http://cancerres.aacrjournals.org/content/suppl/2014/03/27/0008-5472.CAN-13-2797.DC1.html

Cited articles	This article cites 20 articles, 9 of which you can access for free at: http://cancerres.aacrjournals.org/content/74/10/2669.full.html#ref-list-1
Citing articles	This article has been cited by 1 HighWire-hosted articles. Access the articles at: http://cancerres.aacrjournals.org/content/74/10/2669.full.html#related-urls

E-mail alerts	Sign up to receive free email-alerts related to this article or journal.
Reprints and Subscriptions	To order reprints of this article or to subscribe to the journal, contact the AACR Publications Department at pubs@aacr.org.
Permissions	To request permission to re-use all or part of this article, contact the AACR Publications Department at permissions@aacr.org.

Downloaded from concernes aperiournals on on August 10, 2015 @ 2014 American Association for Concer Desearch



BCR-ABL-Induced Deregulation of the IL-33/ST2 Pathway in CD34(+) Progenitors from Chronic Myeloid Leukemia Patients

Anaïs Levescot^{1,2,3}, Stéphane Flamant¹, Sara Basbous^{1,4}, Florence Jacomet^{1,4,5,6}, Olivier Féraud¹, Elvire Anne Bourgeois¹, Marie-Laure Bonnet^{1,6}, Christine Giraud^{1,6,7,8}, Lydia Roy^{4,6,8,9}, Anne Barra^{1,4,5,6}, Jean-Claude Chomel^{1,6,10}, Ali Turhan^{1,4,6,11}, François Guilhot^{1,4,6,8,9}, Jean-Philippe Girard^{12,13}, Jean-Marc Gombert^{1,4,5,6}, and André Herbelin^{1,3,4,6}

Abstract

Although it is generally acknowledged that cytokines regulate normal hematopoiesis in an autocrine/paracrine fashion, their possible role in chronic myelogenous leukemia (CML) and resistance to imatinib mesylate treatment remain poorly investigated. Here, we report that CD34(+) progenitors from patients with CML at diagnosis are selectively targeted by the cytokine/alarmin interleukin (IL)-33. Indeed, CML CD34(+) progenitors upregulate their cell surface expression of the IL-33-specific receptor chain ST2, proliferate and produce cytokines in response to IL-33, conversely to CD34(+) cells from healthy individuals. Moreover, ST2 overexpression is normalized following imatinib mesylate therapy, whereas IL-33 counteracts in vitro imatinib mesylate-induced growth arrest in CML ${\rm CD34}(+)\ progenitors\ via\ reactivation\ of\ the\ STAT5\ pathway,\ thus\ supporting\ the\ notion\ that\ IL-33\ may\ impede\ the\ reactivation\ supporting\ the\ notion\ that\ IL-33\ may\ impede\ the\ reactivation\ supporting\ the\ notion\ that\ IL-34\ may\ impede\ the\ supporting\ the\ notion\ that\ IL-34\ may\ impede\ the\ supporting\ the\ notion\ that\ IL-34\ may\ impede\ the\ supporting\ the\ supporting\ the\ supporting\ the\ support\ suppor$ antiproliferative effects of imatinib mesylate on CD34(+) progenitors in CML. Clinically, the levels of circulating soluble ST2, commonly considered a functional signature of IL-33 signaling in vivo, correlate with disease burden. Indeed, these elevated peripheral concentrations associated with a high Sokal score predictive of therapeutic outcome are normalized in patients in molecular remission. Finally, we evidenced a facilitating effect of IL-33 on in vivo maintenance of CD34(+) progenitors from patients with CML by using xenotransplant experiments in immunodeficient NOG mice, and we showed that engraftment of mouse BCR-ABL-transfected bone marrow progenitors was less efficient in IL-33-deficient mice compared with wild-type recipients. Taken together, our results provide evidence that IL-33/ST2 signaling may represent a novel cytokine-mediated mechanism contributing to CML progenitor growth and support a role for this pathway in CML maintenance and imatinib mesylate resistance. Cancer Res; 74(10); 2669-76. ©2014 AACR.

Introduction

Chronic myelogenous leukemia (CML) is a well-characterized myeloproliferative disorder, initiated by the presence of the Philadelphia chromosome generating the BCR-ABL onco-

Authors' Affiliations: ¹INSERM UMR \$935, Poitiers and Villejuif; ²Université Paris-Sud 11, Orsay; ³INSERM U1082, ⁴Université de Poitiers; ⁵Service d'Immunologie et Inflammation; ⁶CHU de Poitiers; ⁷Etablissement Français du Sang Centre-Atlantique, site de Poiters; ⁹Service d'Incologie Hématologique t'Inérapie Cellulaire; ⁹INSERM-CIC1402; ¹⁰Servico de Cancérologie Biologique; ¹¹Service d'Hématologie et d'Oncologie Biologique, ¹¹Seltiers; ¹²CNRS, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale; and ¹³Université de Toulouse, Toulouse, France

A. Turhan and F. Guilhot contributed equally to this work.

Current address for S. Flamant: IRSN, Fontenay aux Roses, France; and current address for E.A. Bourgeois, Harvard Medical School, Brigham and Women's Hospital, Division of Rheumatology, Immunology and Allergy, Boston, Massachusetts.

Corresponding Author: André Herbelin, U1082 INSERM, Pôle Biologie Santé; 1, rue Georges Bornet BP 633, 86022 Poltiers, France. Phone: 33-5-49-45-43-41; Fax: 33-54-94-53-70; E-mail: andre.herbelin@inserm.fr

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2797

@2014 American Association for Cancer Research.

www.aacrjournals.org

protein, which gives rise to deregulated tyrosine kinase (TK) activity in all leukemic cells (1). Imatinib mesylate, a competitive inhibitor of the BCR-ABL TK activity, is currently used as a first-line therapy of CML (2). Because around 20% of patients develop resistance against imatinib mesylate (2), breaking this resistance remains an important issue for the therapeutic success of this treatment.

A critical role of the environment in the development and control of CML is supported by several reports (3–6). Although leukemic progenitors are believed to reside in a milieu enriched in cytokines, few studies have actually addressed their effects on CD34(+) progenitor functions in patients with CML, apart from the evidence for their capacity to resist imatinib mesylate-induced apoptosis (3–5).

The recently identified interleukin (IL)-33 is the ligand of ST2, a long-known orphan member of the IL-1 receptor superfamily (7). Since its first description, important roles have been ascribed to IL-33, both as a conventional cytokine and as an alarmin, implicated in a number of pathologies (8, 9). Knowing that endothelial cells and osteoblasts (9, 10), two components of the hematopoietic stem cell niche, are the main sources of IL-33, while several immune/hematopoietic cells, including

AAC American Association for Cancer Research 2669

Cance Research

Levescot et al.

primary progenitors (11), constitute its natural targets, we hypothesized that IL-33 might enhance proliferation and/or mediate imatinib mesylate resistance in CML CD34(+) cells. We found that the IL-33 receptor ST2 was constitutively expressed and was functional in leukemic CD34(+) cells because it mediated the proliferation and cytokine production induced by IL-33, whereas CD34(+) cells from healthy donors (HD) neither expressed ST2 nor responded to IL-33. Based on these findings, we further investigated the relationship between BCR-ABL expression and responsiveness to IL-33 as well as its relevance to imatinib mesylate resistance.

Patients and Methods

Patient samples

Twenty-two patients with CML in chronic phase at diagnosis (CML-CP) and sixteen patients with CML currently treated with imatinib mesylate who have achieved major molecular remission [MMR-IM or BCR-ABL/ABL (IS) ≤0.1%; Oncology-Hematology Department, Poitiers, France] were included in this study. All patients gave informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki for participation in the study that was approved by the scientific committee of the INSERM-CIC1402 (Poitiers, France). The 15 healthy individuals were volunteers from the Pôle Biologie Santé (Poitiers, France). Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from blood samples collected on heparin from patients with CML or healthy donors mobilized with granulocyte colonystimulating factor (G-CSF), and CD34(+) cells were further purified using an immunomagnetic cell sorting system (Miltenyi Biotech). Purity was generally above 95% upon reanalysis.

Mice

Six- to 9-week-old female wild-type (Janvier) and IL-33deficient C57BL/6 mice (12), and NOG mice (IGR) were maintained in our animal facilities under specific pathogen-free conditions. All procedures were approved by the Animal Care Use Committee of Poitou-Charentes (CEEA, n°CE2012–018).

Engraftment of human cells in immunodeficient mice

Enriched primary CD34(+) cells (1×10^6) from patient with CML-CP were incubated in serum-free expansion medium (Stem Cell Technologies) supplemented with granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF; 200 pg/mL), stem cell factor (SCF; 200 pg/mL), G-CSF (1 ng/mL), and IL-6 (1 ng/mL) and with or without IL-33. After 3 days, recovered cells (5 × 10⁶) were transplanted intravenously into NOG mice.

Retroviral mouse model of BCR-ABL CML-like syndrome

The retroviral vector MIGR-p210-BCR-ABL as well as the methodologic details of the murine bone marrow retroviral transduction and transplantation model of CML-like myeloproliferative neoplasm have been described in detail elsewhere (13).

Cell cultures

CD34(+) cell cultures were performed in RPMI-1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum and antibiotics. Enriched primary CD34(+) cells from patients with CML-CP or healthy donors were seeded into 96-well round (U)-bottom culture plates (2.5×10^4 per well) and incubated with the indicated compound(s).

In vitro treatment with cytokines and inhibitors

Human II.-33 (50 ng/mL), neutralizing anti-human GM-CSF monoclonal antibody (mAb; 1 µg/mL), and anti-human ST2 mAb (1 µg/mL), and SCF (50 ng/mL) were purchased from R&D Systems and Peprotech, respectively. AG490 (0.05 µmol/L) was purchased from Calbiochem. Imatinib mesylate (Glivec, Novartis) was used at 1 to 2.5 µmol/L depending on the time of exposure.

CFC assays

After a 3-day liquid-phase culture of CD34(+) cells with or without IL-33, remaining cells were harvested and seeded (1 \times 10³/25-mm dish) in methyl-cellulose supplemented with cyto-kines (MethoCult H4434, Stem Cell Technologies), and emerging colonies were counted 14 days later.

ELISA and Luminex

Luminex technology was used according to the manufacturer's instructions to measure GM-CSF, IL-6, and IL-8 in culture supernatants (R&D Systems) and phosphoproteins in cell lysates (Millipore). Soluble ST2 levels were quantified in plasma by ELISA (R&D Systems).

Cell proliferation

For the quantification of CD34(+) cell proliferation, a bromodeoxyuridine (BrdUrd) colorimetric cell proliferation immunoassay was used (Roche). An 18-hour pulse with BrdUrd was performed, and BrdUrd incorporation was quantified by measuring the absorbance (O.D.), as recommended by the manufacturer.

FACS analysis

CD34(+) cells were stained with the following antibodies: anti-CD34-PE-Cy7, anti-CD38-FITC, and anti-p-STAT5-Alexa Fluor 647 (all from BD Biosciences), and anti-ST2-PE mAbs (R&D Systems). Membrane labeling as well as intracellular p-STAT5 staining were performed as previously described (3). A minimum of 1×10^3 viable cell events were acquired in the population of interest. For the quantification of apoptosis, CD34(+) cells were resuspended at room temperature for 15 minutes with Annexin V-FITC and 7-aminoactinomycin D (both from BD Biosciences) and then analyzed immediately. Cells were analyzed by six-color flow cytometry (FACSCanto II, FACSVerse, and FacsDiva software, BD Biosciences). and data were reanalyzed with FlowJo Software (Tree Star). Positive staining for each marker was determined by comparison with appro-

priate isotype-matched negative controls.

Statistical analysis

All statistical analyses used Prism 5 (GraphPad software Inc.). The statistical significance of differences in mean values was analyzed by the two-tailed Mann–Whitney nonparametric



The ST2/IL-33 Axis in CML

Figure 1. CML-CP CD34(+) progenitor cells upregulate ST2 cell-suface expression. A–C, ST2 expression is increased on the cell suface of CML-CP CD34(+) cells. PBMCs from patients with CML-CP, patients with CML currently treated with inatinib mesylate who have achieved MMR (MMR-IM), and healthy donors were analyzed for ST2 expression among gated CD34(+) cells after staining with anti-CD34-PECy7, CD38-FITC, and anti-ST2-PE (or its isotype-matched negative control). A histograms show two representative samples for each group of CML patients or healthy donors (-, ST2 staining; -----, isotype-matched negative control). B and C, ST2 expression on total CD34(+) cells (B) and on CD38(+) or CD38(-) subsets (C) expressed as relative mean fluorescence intensity (MFI signaf/MFI background). Background was established in the same cell populations by staining with a matched isotype control. Each symbol represents one healthy donor or CML patient. Mann--Whitrey nonparametric test. D, the kinase activity of BCR-ABL induces upregulation of ST2 in CD34(+) cells from patients with CML-CP. PBMCs from patients with CML-CP were cultured for 4 hours with or without imatinib mesylate [2.5 µmoVL and analyzed for ST2 expression among gated CD34(+) cells after staining with anti-CD34-PECy7 and anti-ST2-PE (or its isotype-matched negative control). ST2 expression in CML-CP CD34(+) cells expressed as relative MFI (MFI signaf/MFI background) was significantly lower after in vitro imatinib mesylate teatment. Data are expressed as mean ± SEM from three patients with CML-CP. Patient test.

test, paired t test, or Wilcoxon nonparametric test. Differences in numbers of engrafted and disease-free survival mice were compared using Fisher exact test. Results were considered to be statistically significant when P < 0.05.

Results and Discussion

The kinase activity of BCR-ABL upregulates ST2 cell surface expression on CD34(+) cells from patients with CML-CP and UT-7 cells

IL-33 mediates its biologic effects by stimulating the heterodimeric receptor ST2/IL-1RAcP (7). Knowing that IL-1RAcP is upregulated in primitive CML-CP CD34(+) cells (personal datar ref. 14), we first addressed the question whether this applied likewise to its coreceptor ST2. Flow-cytometric analysis revealed substantial ST2 expression on gated CD34(+) PBMCs from most patients with CML-CP examined, conversely to those recovered from healthy donors, which displayed this receptor at very low or undetectable levels (Fig. 1A and B). Importantly, both hematopoietic stem cell-enriched CD34(+) CD38(-) and CD34(+)CD38(+) subsets harbored ST2 contrasting to their counterparts from healthy donors (Fig. 1C). In accordance with a possible contribution of BCR-ABL TK activity to ST2 upregulation, we observed aremarkable reversal

www.aacrjournals.org

of ST2 overexpression, back to healthy donor levels, in patients having achieved MMR with imatinib mesylate therapy (Fig. 1A and B) as well as among gated CD34(+) PBMCs from patients with CML-CP after a 4-hour incubation with imatinib mesylate (Fig. 1D).

To confirm that ST2 could be induced as a corollary of oncogene expression, we transduced UT-7 cells with a retrovirus encoding *BCR-ABL* or with an empty control and found that ST2 was effectively upregulated on the surface of these transfected cells (Supplementary Fig. S1A). Conversely, exposure to imatinib mesylate led to a significant downregulation of ST2 on *BCR-ABL*-transduced UT-7 cells but not on their imatinib mesylate-resistant mutant T315I *BCR-ABL*-transduced controls (Supplementary Fig. S1B; ref. 15). Taken together, these findings show that CML-CP CD34(+) cells overexpress ST2 receptors and designate BCR-ABL TK activity as a plausible mechanism of upregulation.

CD34(+) cells from patients with CML-CP proliferate and produce cytokines in response to IL-33

The constitutive expression of ST2 and IL-1RAcP by CML-CP CD34(+) cells implied that IL-33 could exert a function in these cells. In support of this notion, the viable cell recovery after 3 days of liquid-phase culture with IL-33



Levescot et al.



was higher among enriched primary CD34(+) cells from patients with CML-CP than from healthy donors (Supplementary Fig. S2A), raising the question whether IL-33 behaved like a survival and/or proliferative factor for CML-CP CD34(+) cells. Annexin V expression in CML-CP CD34(+) cells was not modified in these conditions, indicating that apoptosis was not controlled by IL-33 (Supplementary Fig. S3). In keeping with a growth-promoting function, CML-CP CD34(+) cells were significantly increased (Supplementary Fig. S2) and incorporated twice as much BrdUrd upon exposure to IL-33 than their normal counterparts (Fig. 2A). More than 90% of IL-33-induced proliferation of CML-CP CD34(+) was prevented by neutralizing antibodies against ST2, thereby confirming that IL-33 exerts its action in these cells via its specific receptor (Supplementary Fig. S2D). The cytokine/alarmin was as efficient as SCF, which is the only growth factor known so far for its capacity to induce, as a single agent, the selective proliferation of CML-CP CD34(+) cells (Supplementary Fig. S4: ref. 16). Taken together, our results demonstrate that CD34(+) cells from patients with CML-CP express ST2 and

respond to IL-33, whereas their counterpart from healthy individuals does neither. Hence, it can be assumed that by targeting CD34(+) cells from patients with CML-CP, IL-33 behaves like a hematopoietic growth factor.

The human hematopoietic cell population defined by CD34 expression is heterogeneous, with only a small fraction of cells (1%-10%) containing virtually all the in vitro clonogenic potential, and a large percentage of more mature cells. Accordingly, even though hematopoietic stem cell-enriched CD34(+)CD38(-) and CD34(+)CD38(+) subsets both express ST2, the specific target of IL-33 in terms of expansion remains to be identified. However, the fact that the CML-CP CD34(+) cell population retained its overall in vitro clonogenic potential on a per cell basis, once it had proliferated in response to IL-33 (Fig. 2B), supports the conclusion that both clonogenic and more mature CD34(+) cells from patients with CML-CP respond to IL-33. The selective reactivity of CML-CP CD34(+) cells was further evidenced by cytokine production (Fig. 2C) because they secreted more GM-CSF, IL-6, and IL-8 in response to IL-33 than normal CD34(+) cells, for which cytokine production was almost undetectable.

The ST2/IL-33 Axis in CML

IL-33 overcomes imatinib mesylate-induced inhibition of CML-CP CD34(+) cell proliferation by engaging the JAK2/STAT5 pathway

We next addressed the question whether IL-33-induced proliferation of CML-CP CD34(+) cells was maintained upon treatment with a therapeutic dose of 1 μ mol/L (17) of imatinib mesylate, which induces a strong inhibition of cell proliferation. As illustrated in Fig. 3A and B, IL-33 counteracted the inhibitory effect of imatinib mesylate on both proliferation and cytokine production, revealing that in the presence of IL-33, even a marked inhibition of BCR-ABL kinase activity cannot totally block CML-CP CD34(+) progenitor functions. From these findings, it can be surmised that the residual BCR-ABLdependent pathways in leukemic CD34(+) cells that persist despite therapeutically effective imatinib mesylate treatment (2) can be substantially amplified by IL-33. As to the molecular events involved, STAT5, a signaling component acknowledged as a common antiapoptotic and transforming target of BCR-ABL (18), would be a likely candidate. Evidence of its involvement was obtained from both a multiplex assay of phosphorylated signaling proteins and intracellular fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis (Fig. 3C) showing that IL-33 partially restored STAT5 activity in leukemic CD34(+) cells, thus overcoming the inhibitory effect of imatinib mesylate. That JAK2 is also involved in this recovery is suggested by the complete loss of IL-33-induced proliferation in the presence of the JAK2 inhibitor AG490 (Fig. 3D). In this regard, although GM-CSF is known to play an important role in TK inhibitor resistance by engaging the JAK2/STAT5 pathway (3, 4), only 10% to 15% of IL-33-induced proliferation of CML-CP CD34(+)



Figure 3. IL-33 overcomes imatinib mesylate-induced inhibition of CML-CP CD34(+) cell proliferation through STAT5 pathway activation. A–D, erriched primary CD34(+) cell proliferation was determined by an 18-hour pulse of BrdUrd on day 2 and quantified by measuring the absorbance (O.D.). B, Lurninex technology was used to simultaneously measure GM-CSF and IL-6 in supematants from 2-day CD34(+) cell cultures. Data are mean \pm SEM from three separate experiments. Each symbol represents one patient with CML-CP, Wilcoxon nonparametric test. C, IL-33 increases levels of phosphorylated STAT5 in imatinib mesylate-treated leukemic CD34(+) progenitors. Left, enriched primary CD34(+) cells (0.5 \times 10⁶ per well) from patients with CML-CP (*n* = 5) were incubated for 12 hours in the presence of imatinib (1 µmoVI) with or without IL-33 (50 ng/mL). Phosphorylated proteins (CREB (Ser133), JJK (Thr183/Tyr185), NF-x8 (Ser536), p38 (Thr180/Tyr182), ERK (Thr185/Tyr187), XKT (Ser473), p70S6K (Thr412), STAT3 (Ser133) and STAT5A/B (Tyr694/699)] in cell lysate (25 µg total protein) were quantified by measuring the man fluorescence intensity (MFI) using a protein target Lurninex assay (Millipore). Data are mean \pm SEM. Wilcoxon nonparametric test. Right, intracellular phosphorylated STAT53 (csr536), p38 (Thr180/Tyr182), ERK (Thr1815/Tyr187), XKT (Ser473), p70S6K (Thr412), STAT3 (Ser133) and STAT5A/B (Tyr694/699)] in cell lysate (25 µg total protein) were quantified by measuring the mean fluorescence intensity (MFI) using a protein target Lurninex assay (Millipore). Data are mean \pm SEM. Wilcoxon nonparametric test. Right, intracellular phosphorylated STAT5a (csr536), p38 (thr18-34 (created leuker), corescentare experiment out of three is shown. O, the JAKZ betwee control (gray dotted line). One representative experiment out of three is shown. O, the JAKZ betwee control (gray dotted line). One representative experiment out of three is shown. O, the JAKZ the hibitor AG480 neutralizes the effect of IL-33 in restoring proliferation

www.aacrjournals.org

Levescot et al



Figure 4. Evidence for a facilitating effect of IL-33 on *In vivo* maintenance of CD34(+) progenitors from patients with CML and mouse BCR-ABLtransfected bone marrow progenitors. A and B, xenotransplant experiments in immunodeficient NOG mice. CD34(+) cells from patients with CML-CP (n = 5) were cultured for 96 hours with or without IL-33 (50 ng/mL) and transplanted (5×10^6 cells/mouse) into sublethally irradiated (3 Gy) NOG mice. Mice were euthanized after 4 weeks, and marrow contents were obtained. A, graphs showing human cell engraftment in bone marrow assessed by labeling with anti-human CD45-PercP-Cy55 antibody (BD Biosciences) and analyzed by flow cytometry. Wilcoxon nonparametric test. B, specific cell subsets were detected by using antibodies to human CD33-PE, CD11b-PE, CD3-FIC, and CD19-APC (all from BD Biosciences). C and D, comparison of leukemic cell engraftment and disease-free survival between wild-type and IL-33-deficient mice receiving p210-*BCR*-ABL-transduced bone marrow cells. Donor wild typemice were injected with 5-fluorouracil (150 mg/kg). After 4 days, mice were sacrificed, and enriched bone marrow cells used to mand works as expecision (1.10⁶) were transplanted into lettally irradiated (9.5 Gy) wild-type or IL-33-deficient mice. (evented counts (20%-e0%) of circulating leukocytes expressing GFP (coexpressed from the *BCR-ABL*-carrying retrovirus) were evidenced in all wild-type recipients (n = 10) as early as 12 days posttransplantation, in clear contrast with the low counts (<2%) of GFP(+) leukocytes (P < 0.05, Fisher exact test recovered in four out of 10 IL-33-deficient recipients on the same time point. A representative experiment out of two is shown. The dotted line separates engrafted from monengrafted mice. D, Kaplan-Meier survival curves for wild-type (n = 16) or IL-33-deficient (n = 15) recipients of p210-*BCR-ABL*-tarsduced bone marrow cells. Disease-free survival was prolonged in IL-33-deficient animals, whereas all wild-type mice succumbed to a CML-like

was prevented by neutralizing antibodies against GM-CSF (Supplementary Fig. S5). Together, these data are consistent with the involvement of the JAK2/STAT5 pathway (19) operating independently from GM-CSF. They reveal a new mechanism of cytokine-mediated imatinib mesylate resistance through IL-33-induced leukemic CD34(+) cell proliferation.

ST2 upregulation correlates with disease burden

Clinically, high circulating levels of IL-33 were detected only in 3 patients out of 15 analyzed. However, because it is commonly acknowledged that a reliable detection of the secreted form of this cytokine is difficult, we assessed instead the levels of soluble ST2 (sST2), which may act as a quencher of IL-33 and is regarded as a functional signature of IL-33 signaling *in viro* (20). Indeed, high amounts of circulating sST2 were detected in the plasma from patients with CML-CP (mean \pm SEM: 678.1 \pm 121.4 pg/mL), whereas low/undetectable levels were measured in healthy donors (mean \pm SEM: 75.5 \pm 15.2 pg/mL) and MMR-IM patients (mean ± SEM: 74.1 ± 17.4 pg/mL; Supplementary Fig. S6A). Interestingly, circulating sST2 levels were highest among patients with high Sokal risk score, which is predictive of therapeutic outcome (Supplementary Fig. S6B). This finding, together with the reduction of circulating sST2 in patients in molecular remission (Supplementary Fig. S6A), establishes a relationship with clinical stages and outcomes. Finally, even though high amounts of peripheral sST2 are probably in part a consequence of increased leukemic cell mass, we provide evidence that IL-33 contributes to the proliferation and maintenance of BCR-ABL cells. Supporting this conclusion, we also evidenced an effect of IL-33 on in vivo maintenance of CD34(+) progenitors from patients with CML by using xenotransplant experiments in immunodeficient NOG mice. In comparison with their untreated counterparts, CML CD34(+) cells cultured with IL-33 demonstrated

Cancer Research

The ST2/IL-33 Axis in CML

significantly increased engraftment in bone marrow of NOG mice at 4 weeks after transplantation (Fig. 4A and Supplementary Fig. S7A), which was associated with an unmodified cell distribution, as revealed by the same proportion of CD33and/or CD11b-expressing myeloid cells in treated and untreated CD34(+) progenitors (Fig. 4B). These results extend our ex vivo data and demonstrate a facilitating effect of IL-33 on in vivo maintenance of CD34(+) progenitors from patients with CML. Finally, taking advantage of the availability of IL-33deficient mice (12), which were used as recipients in a retroviral BCR-ABL transduction-transplantation model of CML-like syndrome (13), we were able to address the impact of endogenous IL-33 on CML development in vivo. As expected, 12 days after transplantation of a high dose of mouse BCR-ABL-GFPtransfected bone marrow progenitors, an elevated proportion (20%-80%) of circulating CML leukocytes was evidenced in all wild-type recipients (n = 10; Fig. 4C and Supplementary Fig. S7B). This clearly contrasted with the low proportion (<2%) of CML circulating leucocytes recovered in four out of 10 IL-33-deficient recipients analyzed in the same experimental setting. Accordingly, although all wild-type mice succumbed to BCR-ABL-induced CML-like syndrome after 3 to 4 weeks, overall survival was significantly prolonged in the IL-33-deficient mice (Fig. 4D and Supplementary Fig. S7C). Hence, we propose that IL-33 facilitates the development of leukemia by inducing and/or enhancing the proliferation of hematopoietic progenitors, including probably stem cells, in the bone marrow microenvironment from patients with CML-CP.

Recent studies provide definite evidence for the kinase activity of BCR-ABL in CML stem cells and for its inhibition by imatinib mesylate without affecting their survival (5). Here, we show that despite the addition of imatinib mesylate at a therapeutically effective dose of 1 µmol/L that blocks TK activity, CML progenitor cells maintain their proliferative response to IL-33. Hence, it might be argued that IL-33, as a component of the microenvironment, may also contribute to the loss of oncogene "addiction" of leukemic stem cells thereby rendering them resistant to imatinib mesylate treatment. Further experimental studies in mice are needed to determine whether in vivo IL-33 is capable of opposing the action of imatinib mesylate on BCR-ABL(+) progenitors in vivo.

References

- 1. Goldman JM, Melo JV. Chronic myeloid leukemia advances in biology and new approaches to treatment. N Engl J Med 2003; 349:1451-64
- Druker B, Guilhot F, O'brien SG, Gathmann I, Kantarjian H, Gattermann 2. N. et al. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukaemia. N Engl J Med 2006;355:2408-7.
- Wang Y, Cai D, Brendel C, Barett C, Erben P, Manley PW, et al. 3. Adaptive secretion of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) mediates imatinib and nilotinib resistance in BCR/ ABL+ progenitors via JAK-2/STAT-5 pathway activation. Blood 2007; 109:2147-55.
- Hiwase DK, White DL, Powell JA, Saunders VA, Zrim SA, Frede AK, 4. et al. Blocking cytokine signaling along with intense Bcr-Abl kinase inhibition induces apoptosis in primary CML progenitors.Leukemia 2010:24:771-8.

In conclusion, our findings demonstrate that IL-33 is capable of sustaining constitutive proliferation as well as cytokine production in leukemic progenitors of patients with CML, and support the hypothesis that the IL-33/ST2 pathway is involved in the control of leukemic cell fate. They also provide an explanation for the selective targeting of CML-CP progenitor cells by IL-33, a feature that is not shared by other hematopoietic factors that cannot discriminate between normal and CML-CP progenitor cells. It remains to determine whether selective targeting of CML progenitors expressing ST2 would be a new useful therapeutic approach.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

L. Roy is consultant/advisory board member of Novartis and BMS. A Turhan has received honoraria from the speakers' bureau of Bristol Myers Squibb. No potentials conflicts of interest were disclosed by the other authors.

Authors' Contributions

onception and design: A. Levescot, O. Feraud, J.-P. Girard, J.-M. Gombert, Herbelin Development of methodology: A. Levescot, S. Flamant, E.A. Bourgeois, M.-L.

Bonnet Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.): A. Levescot, F. Jacomet, C. Giraud, I. Roy, A. Turhan, F. Guilhot, L-P. Girard

F. Guilhot, J-P. Girard Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis): A. Levescot, S. Flarnant, S. Baebous, F. Jacomet, O. Feraud, A. Barra, J-C. Chomel, J-M. Gombert, A. Herbelin Writing, review, and/or revision of the manu script A. Levescot, S. Flarnant, J-C. Chomel, A. Turhan, F. Guilhot, J.-P. Girard, J.-M. Gombert, A. Herbelin

Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or orga-nizing data, constructing databases): E.A. Bourgeois, A. Turhan Study supervision: A. Herbelin

Acknowledgments

The authors thank the technical assistance of A. Robin, M. Charron, A. Delwail, N. Piccirilli, M. Ferhat, S. Giraud, P. Gonin, P. Mercier, and F. Berneron and E. Schneider, J. Arsham, and F. Zavala for critically reviewing the manuscript.

Grant Support

This work was supported by INSERM, CHU de Poitiers, Université Paris Sud 11 (AAP+Attractivité + 2011), Université de Poitiers, Ligne contrele Cancer (Comité de la Vienne et Comité du Val-de-Marne), ABIM-PC (Association pour la Recherche en Immunologie-Poitou-Charentes), Sport & Collection, and Ministère de la Recherche.

Received October 1, 2013; revised February 28, 2014; accepted March 6, 2014; published OnlineFirst March 27, 2014.

- 5. Corbin AS, Agarwal A, Loriaux M, Cortes J, Deininger MW, Druker BJ. Human chronic myeloid leukemia stem cells are insensitive to imatinib despite inhibition of BCR-ABL activity. J Clin Invest 2011;121: 396-409
- Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, 6 et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mis-matched hematopoietic transplants. Science 2002;295:2097–100.
- Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan Tk, et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 7. receptor-related protein ST2 and induces Thelper type 2-associated cytokines. Immunity 2005;23:479–90. Carriere V, Roussel L, Ortega N, Lacorre DA, Americh L, Aguilar L, et al.
- 8. IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A 2007; 104:282-7.
- Moussion C, Ortega N, Girard JP. The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel 'alarmin'? PLoS ONE 2008;3:e3331.
- Schulze J, Bickert T, Bell FT, Zaiss MM, Albers J, Wintges K, et al. Interleukin-33 is expressed in differentiated osteoblasts and blocks osteoclast formation from bone marrow precursor cells. J Bone Miner Res 2011;26:704–17.
- Allakhverdi Z, Comeau MR, Smith DE, Toy D, Endam LM, Desrosiers M, et al. CD34+ hemopoietic progenitor cells are potent effectors of allergic inflammation. Allergy Clin Inmmunol 2009;123:472–8.
 Pichery M, Mirey E, Mercler P, Lefrancais E, Dujardin A, Ortega N, et al.
- Pichery M, Mirey E, Mercier P, Lefrancais E, Dujardin A, Ortega N, et al. Endogenous IL-33 is highly expressed in mouse epithelial barrier tissues, lymphoid organs, brain, embryos, and inflamed tissues: in situ analysis using a novel II-33-LacZ gene trap reporter strain. J Immunol 2012;188:3488–95.
- Flamant S1, Kortulewski T, Dugray A, Bonnet ML, Guillier M, Guilhot F, et al. Osteopontin is upregulated by BCR-ABL. Biochem Biophys Res Commun 2005;333:1378–84.
- Järás M, Johnels P, Hansen N, Agerstam H, Tsapogas P, Rissler M, et al. Isolation and killing of candidate chronic myeloid leukemia stem cells by antibody targeting of IL-1 receptor accessory protein. Proc Natl Acad Sci U S A 2010;107:16280–5.

- Gorre ME, Mohammed M, Elwood K, Hsu N, Paquette R, Rao PN, et al. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. Science 2001;293: 876–80.
- Moore S, Haylock DN, Lévesque JP, McDiarmid LA, Samels LM, To LB, et al. Stemcell factor as a single agent induces selective proliferation of the Philadelphia chromosome positive fraction of chronic myeloid leukemia CD34(+) cells. Blood 1998;92:2461–70.
 Peng B, Hayes M, Resta D, Racine-Poon A, Druker BJ, Talpaz M,
- Peng B, Hayes M, Resta D, Racine-Poon A, Druker BJ, Talpaz M, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of imatinib in a phase I trial with chronic myeloid leukemia patients. J Clin Oncol 2004;22:935–42.
- Horita M, Andreu EJ, Benito A, Arbona C, Sanz C, Benet I, et al. Biockade of the Bcr-Abl kinase activity induces apoptosis of chronic myelogenous leukemia cells by suppressing signal transducer and activator of transcription 5-dependent expression of BcI-xL. J Exp Med 2000;191:977–84.
- Funakoshi-Tago M, Tago K, Sato Y, Tominaga S, Kasahara T. JAK2 is an important signal transducer in IL-33-induced NF-xB activation. Cell Signal 2011;23:86–70.
 Liew FY, Pitman NI, McInnes IB. Disease-associated functions of IL-
- Liew FY, Pitman NI, McInnes IB. Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. Nat Rev Immunol 2010;10:103–10.

Cancer Research

Downloaded from cancerres.aacrjournals.org on August 10, 2015. © 2014 American Association for Cancer Research.

Supplementary Figure Legends

Supplementary Figure S1. The kinase activity of BCR-ABL induces upregulation of ST2 in UT7 cells. The GM-CSF-dependent megakaryoblastic leukemia cell line UT-7 was transduced with a retrovirus encoding GFP (UT-7-GFP) or GFP linked by an IRES sequence to *BCR-ABL* (UT-7-p210-GFP) or *BCR-ABL* with mutation of the T315 residue (UT-7-p210-T315I-GFP) as previously reported by Issaad C *et al.* (Leukemia. 2000, 14(4):662-70). Both cell lines were cultured in the presence of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rhGM-CSF, 10 ng/mL) purchased from R&D Systems. A-B) The transduced UT-7 cells were analyzed for ST2 expression after staining with anti-ST2-PE (or its isotype-matched negative control: --- grey dotted lines). (A) Left panel: a representative histogram overlay showing expression of ST2 in UT-7-GFP cells (— grey solid line) or UT-7-p210-GFP cells (— black solid line). Right panel: ST2 MFI is significantly lower in UT-7-GFP cells than in UT-7-p210-GFP cells. Data are expressed as means ± SEM from three separate experiments. Mann-Whitney non-parametric test. (B) UT-7-GFP cells (left panel), UT-7- p210-GFP cells (middle panel) or UT-7-p210-T315I-GFP cells (right panel) were cultured for 2 days with or without IM (1µM). Each histogram overlay shows the expression of ST2 in IM-treated cells (— grey solid lines) or untreated cells (— black solid lines). One representative experiment out of three is shown.

Supplementary Figure S2. CML-CP CD34(+) cells proliferate in response to IL-33. (A-D) Enriched primary CD34(+) cells ($2.5x10^4$ per well) from CML-CP patients or HDs were incubated for several days in the presence of IL-33 (50 ng/mL) with or without neutralizing anti-human ST2 antibody (anti-ST2, 1 µg/ml) or isotype-matched control (IgG, 1 µg/ml). (A) Viable cell recovery was calculated by dividing viable cell counts from 3-day cultures with IL-33 by those from cultures without IL-33. Each symbol represents one HD or CML-CP patient. Mann-Whitney non-parametric test. (B) CML-CP CD34(+) cells were incubated with (—) or without (---) IL-33 and were collected at day 3, 5 or 8 and viable cells were counted. (C) CD34(+) cell proliferation was determined by an 18-h pulse with BrdU on day 2, 4 or 7 and quantified by measuring the absorbance (O.D.). Data are means ± SEM from three separate experiments. Wilcoxon non-parametric test. (D) CD34(+) cell proliferation was determined by an 18-h pulse with BrdU on day 2 and quantified by measuring the absorbance (O.D.). Data are means ± SEM from three separate experiments. Wilcoxon non-parametric test. Wilcoxon non-parametric test. Wilcoxon non-parametric test.

Supplementary Figure S3. IL-33 does not modulate apoptosis of CD34(+) cells from CML-CP patients.

Enriched primary CD34(+) cells $(2.5 \times 10^4$ per well) from CML-CP patients were incubated for 3 days with or without IL-33 (50 ng/mL). **(A)** Dot-plot profiles of CD34(+) cells from CML-CP patients stained with annexin-V-FITC and 7-AAD. Annexin-V and 7-AAD staining allowed to discriminate viable (annexin-V(-)/7-AAD(-)), apoptotic (annexin-V(+)/7-AAD(-)), and dead (annexin-V(+)/7-AAD(+)) cells. **(B)** Each symbol represents the percentage of CD34(+) apoptotic cells from a CML-CP patient. Paired *t* test. N.S. : not significant. Supplementary Figure S4. IL-33 is as efficient as SCF in inducing proliferation of CML-CP CD34(+) cells. Enriched primary CD34(+) cells $(2.5 \times 10^4 \text{ per well})$ from CML-CP patients were incubated for 3 days with or without IL-33 (50 ng/mL) or SCF (50 ng/mL). On day 2, cell proliferation was determined by an 18-h pulse of BrdU. Data are means ± SEM from three separate experiments. Wilcoxon non-parametric test. N.S.: not significant.

Supplementary Figure S5. CML-CP CD34(+) cells proliferate in response to IL-33 independently from GM-CSF. Enriched primary CD34(+) cells (2.5x10⁴ per well) from CML-CP patients were incubated for 3 days with or without IL-33 (50 ng/mL) and/or anti-GM-CSF (1 mg/mL). On day 2, CD34(+) cell proliferation was determined by an 18-h pulse of BrdU. Each symbol represents one CML-CP patient. Data are means ± SEM from three separate experiments. Wilcoxon non-parametric test. N.S.: not significant.

Supplementary Figure S6. CML is associated with high circulating levels of soluble ST2: reversion after IM therapy. (A-B) Soluble ST2 concentrations in the plasma of CML-CP patients (n = 15), HDs (n = 29) and MMR-IM patients (n=10) were quantified by ELISA (R&D Systems). (A) Each symbol represents one HD or CML-CP patient. Student's t test. (B) Plasma sST2 levels in CML-CP patients relative to the Sokal score predictive of therapeutic outcome. CML-CP patients are divided into low- (score < 0.8; n = 5), intermediate- (score of 0.8 to 1.2; n = 5) and high-(score > 1.2; n = 4) risk groups. Each symbol represents one CML-CP patient. Mann-Whitney non-parametric test. N.S.: not significant.

Supplementary Figure S7. Xenotransplant experiments in immunodeficient NOG mice (A); Mouse model of CML-like induced syndrome (B-C). Representative flow cytometry dot-plots of CD45 versus CD33 expression showing human cell engraftment in mouse bone marrow after 4 weeks posttransplantation of CD34(+) cells pretreated *in vitro* for 96 hours with IL-33 (right dot-plot) or without IL-33 (left dot-plot). The percentage of cells in each quadrant is indicated. (B-C) Data are from a representative animal of either wild-type leukemic (left: wild-type CML⁺), IL-33-deficient leukemic (middle: IL-33-deficient CML⁺) or IL-33-deficient disease-free (right: IL-33-deficient CML⁻) group of mice. (B) Use of a retroviral vector coexpressing p210-BCR-ABL and GFP allows determining the counts of BCR-ABL-expressing cells among circulating leukocytes. The numbers indicate percentages of leukemic (GFP-BCR-ABL(+)) cells among total circulating blood leukocytes 12 days after transplantation. (C) Spleens of the indicated groups of mice are shown (values in parentheses indicate the weights). Spleen weights from mice transduced with a control retrovirus encoding GFP: 0.08 to 0.1 grams.



Supplementary Figure S1. The kinase activity of BCR-ABL induces upregulation of ST2 in UT7 cells. The GM-CSF-dependent megakaryoblastic leukemia cell line UT-7 was transduced with a retrovirus encoding GFP (UT-7-GFP) or GFP linked by an IRES sequence to BCR-ABL (UT-7-p210- GFP) or BCR-ABL with mutation of the T315 residue (UT-7-p210-T315I-GFP) as previously reported by Issaad C et al. (Leukemia. 2000, 14(4):662-70). Both cell lines were cultured in the presence of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rhGM-CSF, 10 ng/mL) purchased from R&D Systems. A-B) The transduced UT-7 cells were analyzed for ST2 expression after staining with anti-ST2-PE (or its isotype-matched negative control: --- grey dotted lines). (A) Left panel: a representative histogram overlay showing expression of ST2 in UT-7-GFP cells (- grey solid line) or UT-7- p210-GFP cells (- black solid line). Right panel: ST2 MFI is significantly lower in UT-7-GFP cells than in UT-7-p210-GFP cells. Data are expressed as means ± SEM from three separate experiments. Mann-Whitney non-parametric test. (B) UT-7-GFP cells (left panel), UT-7- p210-GFP cells (middle panel) or UT-7-p210-T315I-GFP cells (right panel) were cultured for 2 days with or without IM (1µM). Each histogram overlay shows the expression of ST2 in IM-treated cells (- grey solid lines) or untreated cells (- black solid lines). One representative experiment out of three is shown.



Supplementary Figure S2. CML-CP CD34(+) cells proliferate in response to IL-33. (A-D) Enriched primary CD34(+) cells ($2.5x10^4$ per well) from CML-CP patients or HDs were incubated for several days in the presence of IL-33 (50 ng/mL) with or without neutralizing antihuman ST2 antibody (anti-ST2, 1 µg/ml) or isotype-matched control (IgG, 1 µg/ml). (A) Viable cell recovery was calculated by dividing viable cell counts from 3-day cultures with IL-33 by those from cultures without IL-33. Each symbol represents one HD or CML-CP patient. Mann-Whitney non-parametric test. (B) CML-CP CD34(+) cells were incubated with (—) or without (---) IL-33 and were collected at day 3, 5 or 8 and viable cells were counted. (C) CD34(+) cell proliferation was determined by an 18-h pulse with BrdU on day 2, 4 or 7 and quantified by measuring the absorbance (O.D.). Data are means \pm SEM from three separate experiments. Wilcoxon non-parametric test. (D) CD34(+) cell proliferation was determined by an 18-h pulse with BrdU on day 2 and quantified by measuring the absorbance (O.D.). Data are means \pm SEM from three separate experiments. Wilcoxon non-parametric test.



Supplementary Figure S3. IL-33 does not modulate apoptosis of CD34(+) cells from CML-CP patients. Enriched primary CD34(+) cells (2.5x10⁴ per well) from CML-CP patients were incubated for 3 days with or without IL-33 (50 ng/mL). (A) Dot-plot profiles of CD34(+) cells from CML-CP patients stained with annexin-V-FITC and 7-AAD. Annexin-V and 7-AAD staining allowed to discriminate viable (annexin-V(-)/7-AAD(-)), apoptotic (annexin-V(+)/7-AAD(-)), and dead (annexin-V(+)/7-AAD(+)) cells. (B) Each symbol represents the percentage of CD34(+) apoptotic cells from a CML-CP patient. Paired *t* test. N.S. : not significant.



Supplementary Figure S4. IL-33 is as efficient as SCF in inducing proliferation of CML-CP CD34(+) cells. Enriched primary CD34(+) cells (2.5x10⁴ per well) from CML-CP patients were incubated for 3 days with or without IL-33 (50 ng/mL) or SCF (50 ng/mL). On day 2, cell proliferation was determined by an 18-h pulse of BrdU. Data are means ± SEM from three separate experiments. Wilcoxon non-parametric test. N.S.: not significant.



Supplementary Figure S5. CML-CP CD34(+) cells proliferate in response to IL-33 independently from GM-CSF. Enriched primary CD34(+) cells $(2.5 \times 10^4$ per well) from CML-CP patients were incubated for 3 days with or without IL-33 (50 ng/mL) and/or anti-GM-CSF (1 \Box g/mL). On day 2, CD34(+) cell proliferation was determined by an 18-h pulse of BrdU. Each symbol represents one CML-CP patient. Data are means \pm SEM from three separate experiments. Wilcoxon non-parametric test. N.S.: not significant.



Supplementary Figure S6. CML is associated with high circulating levels of soluble ST2: reversion after IM therapy. (A-B) Soluble ST2 concentrations in the plasma of CML-CP patients (n = 15), HDs (n = 29) and MMR-IM patients (n=10) were quantified by ELISA (R&D Systems). (A) Each symbol represents one HD or CML-CP patient. Student's t test. (B) Plasma sST2 levels in CML-CP patients relative to the Sokal score predictive of therapeutic outcome. CML-CP patients are divided into low- (score < 0.8; n = 5), intermediate- (score of 0.8 to 1.2; n = 5) and high-(score > 1.2; n = 4) risk groups. Each symbol represents one CML-CP patient. Mann-Whitney non-parametric test. N.S.: not significant.



Supplementary Figure S7. (A) Xenotransplant experiments in immunodeficient NOG mice. Representative flow cytometry dot-plots of CD45 versus CD33 expression showing human cell engraftment in mouse bone marrow after 4 weeks post-transplantation of CD34(+) cells pretreated in vitro for 96 hours with IL-33 (right dot-plot) or without IL-33 (left dot-plot). The percentage of cells in each quadrant is indicated. (B-C) Mouse model of CML-like induced syndrome. Data are from a representative animal of either wild-type leukemic (left: wild-type CML⁺), IL-33-deficient leukemic (middle: IL-33-deficient CML⁺) or IL-33deficient disease-free (right: IL-33-deficient CML⁻) group of mice. (B) Use of a retroviral vector coexpressing p210-BCR-ABL and GFP allows determining the counts of BCR-ABL-expressing cells among circulating leukocytes. The numbers indicate percentages of leukemic (GFP-BCR-ABL(+)) cells among total circulating blood leukocytes 12 days after transplantation. (C) Spleens of the indicated groups of mice are shown (values in parentheses indicate the weights). Spleen weights from mice transduced with a control retrovirus encoding GFP: 0.08 to 0.1 grams.

La voie Rho/ROCK, un nouveau mécanisme d'échappement des cellules leucémiques au contrôle du système immunitaire T inné

Les cellules iNKT et T CD8 innées sont présumées contribuer à l'immunosurveillance (IS) des cancers et sont fonctionnellement déficientes dans la leucémie myéloïde chronique (LMC). Notre hypothèse était que ces défauts résultent de l'incapacité des cellules dendritiques myéloïdes (mDC) à les activer. Des analyses par cytométrie en flux et microscopie confocale ont révélé une baisse de l'expression membranaire de CD1d, qui présente les antigènes aux cellules iNKT, à la surface des mDC des patients LMC, par comparaison aux sujets sains. Ce défaut n'est associé ni à un défaut de maturation des mDC, comme le montre l'expression normale de HLA-DR et de CD86, ni à une baisse d'expression intracellulaire de CD1d ou de son transcrit. Ces résultats sont conciliables avec une rétention intracellulaire. Le traitement in vitro des mDC des patients LMC avec un inhibiteur de la protéine ROCK restaure partiellement l'expression de surface de CD1d et la présentation antigénique par CD1d, alors qu'il n'a eu aucun effet sur les mDC des sujets sains. Nous proposons que la protéine ROCK, qui est activée par le domaine DH-PH de BCR-ABL, interfère avec la réponse immunitaire dépendant des lymphocytes iNKT au cours de la LMC par régulation négative de l'expression membranaire de CD1d des mDC. Le fait que les cellules iNKT et T CD8 innées retrouvent des fonctions normales après rémission complète de la LMC est en faveur d'une génération de cellules T CD8 innées dépendante des cellules iNKT, comme décrit chez la souris. Notre travail suggère une implication des cellules iNKT et T CD8 innées dans l'IS de la LMC et révèle l'axe ROCK/mDC comme une nouvelle cible thérapeutique dans la maladie.

Mots clés : BCR-ABL, cellules iNKT, cellules dendritiques, voie Rho/ROCK, Imatinib, inhibiteur de ROCK, inhibiteur de tyrosine kinase, cellules T mémoires innées, immunité innée, LMC

The Rho/ROCK pathway as a new pathological mechanism of innate T cell immune subversion in chronic myeloid leukemia

CD1d-restricted iNKT cells and innate CD8 T cells are believed to play a key role in cancer immune surveillance and are functionally deficient in chronic myeloid leukemia (CML). Herein, we have hypothesized that this defect might originate from BCR-ABL-dependent dysfunctions in myeloid dendritic cells (mDC). Indeed, flow cytometry and confocal microscopy revealed that cell-surface expression of CD1d was downregulated in CML mDC, relative to healthy donor (HD) controls. The decreased cell-surface display of CD1d could not be ascribed to defective mDC differentiation, as attested by normal expression of HLA-DR and the CD86 maturation marker. On the other hand, reduced membrane expression was not associated with decreased intracytoplasmic levels of CD1d or its mRNA transcripts, consistent with intracellular retention. In vitro treatment of CML mDC with the Rho-associated protein Kinase (ROCK) inhibitor Y-27632 partially restored both cell-surface CD1d expression and CD1d-mediated antigen presentation, while it had no effect on HD mDC. We propose that ROCK, which is most likely activated by the DH-PH domain of BCR-ABL, mediates iNKT-cell immune subversion in CML patients by downregulating CD1d expression on CML mDC. Remarkably, both iNKT cells and innate CD8 T cells returned to normal after complete CML remission, a finding consistent with a iNKT cell-dependent generation of innate CD8 T cells, similarly to the observations in mice. All in all, our study supports the possible contribution of iNKT/innate CD8 T cells to tumor surveillance in CML, and reveals the ROCK/mDC axis as a new potential target to restore immune surveillance in CML.

Key words: BCR-ABL, iNKT cells, dendritic cells, Rho/ROCK pathway, Imatinib, ROCK inhibitor, tyrosine kinase inhibitor, innate-memory T cells, innate immunity, LMC

Laboratoire de rattachement : INSERM U1082

Ischémie Reperfusion en Transplantation d'Organes : Mécanismes et Innovations Thérapeutiques Pôle Biologie Santé 1, rue Georges Bonnet 86022 POITIERS Cedex