



HAL
open science

Impact du G-CSF sur le phénotype et les fonctions des cellules NK dans le cadre d'une immunothérapie post-allogreffe de cellules souches hématopoïétiques

Yu Xiong

► **To cite this version:**

Yu Xiong. Impact du G-CSF sur le phénotype et les fonctions des cellules NK dans le cadre d'une immunothérapie post-allogreffe de cellules souches hématopoïétiques. Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2016. Français. NNT : 2016LORR0106 . tel-01441455

HAL Id: tel-01441455

<https://theses.hal.science/tel-01441455v1>

Submitted on 19 Jan 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

par **Yu XIONG**

**Impact du G-CSF sur le phénotype et les fonctions des cellules NK dans le cadre
d'une immunothérapie post-allogreffe de cellules souches hématopoïétiques**

Le 27 juillet 2016

Membres du jury :

Rapporteurs :	Pr Christian CHABANNON	PU-PH, institut Paoli Calmette, Marseille
	Pr Catherine PAILLARD	PU-PH, CHRU, Strasbourg
Directeur de thèse :	Pr Danièle BENSOUSSAN	PU-PH, UTCT, CHRU de Nancy et UMR7365
Co-directeur de thèse :	Dr Véronique DECOT	MCU-PH, UTCT, CHRU de Nancy et UMR7365

UMR 7365 CNRS-Université de Lorraine et FR 3209-IMoPA-Biopôle.

Remerciements

Cher Papa, Chère Maman,

Vous étiez toujours ma source de motivation, d'inspiration et de force. Sans votre amour jamais je n'aurais eu la force de mener à bien cette aventure si loin de mon pays.

Mon cher mari Qicong DUAN,

Merci beaucoup pour aller en France avec une grande valise remplie de collations chinoises et m'accompagner pendant un mois. Ton soutien et ta gentillesse ont toujours été des éléments indispensables à ma réussite.

Ma soeur, mon beau-frère et mon neveu,

Merci beaucoup pour bien s'occuper de nos parents quand j'étais en France. Mon neveu, mes rires, ta tante t'adore et sera toujours fière de toi.

Mes tantes, mes oncles, mes cousines et cousins

Merci pour vos encouragements.

A Madame le Professeur Danièle BENSOUSSAN

Merci d'avoir accepté de diriger cette thèse. Merci pour de m'avoir accueillie dans son laboratoire et de m'avoir permis de réaliser cette thèse.

A Madame le Docteur Véronique DECOT

J'exprime ma profonde reconnaissance à Madame le Docteur Véronique DECOT d'avoir encadré mon travail et de m'avoir accompagnée sans relâche jusqu'à la rédaction de ce mémoire. Je la remercie vivement pour la formation scientifique qu'elle a su me transmettre avec beaucoup de pédagogie et avec une grande rigueur. Elle a toujours su me soutenir et me motiver dans les moments difficiles afin que je puisse mener à bien mon projet. Ces trois ans de travail resteront pour moi une agréable aventure grâce à sa gentillesse et à ses grandes qualités humaines.

A Monsieur le Professeur Patrick MENU

Je tiens à remercier Monsieur Patrick MENU, le chef de notre équipe, pour sa gentillesse et pour son soutien.

A Monsieur le Professeur Jean-Yves JOUZEAU

Je remercie également Monsieur Jean-Yves Jouzeau, le directeur de l'UMR 7365, pour m'avoir accueillie dans l'unité de recherche.

A Madame le Professeur Catherine PAILLARD

Merci d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail. Je vous remercie pour les remarques constructives que vous avez formulées.

A Monsieur le Professeur Christian CHABANNON

Merci d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail. Je vous remercie pour les remarques constructives que vous avez formulés.

A toutes les personnes qui contribuent à la collaboration entre Nancy et Wuhan

A Monsieur le Professeur Jean-François STOLTZ

Merci pour votre soutien et vos encouragements. Merci pour votre mobilisation pour faire vivre la collaboration franco-chinoise.

A Monsieur le Professeur Yunfeng ZHOU

Merci pour votre soutien et vos encouragements.

A Monsieur le Professeur Yan ZHAO

Merci pour votre soutien et vos encouragements.

Un grand merci également

A Monsieur le Professeur Gilbert FAURE

A Monsieur le Professeur Jacques HUBERT

A tous mes collègues et mes amis de France et de Chine

Merci pour votre aide au quotidien, votre soutien et votre amitié. Les mots sont faibles pour vous exprimer ma profonde reconnaissance et ma gratitude pour tout ce que vous m'avez apporté.

A tous mes amis à l'UTCT

Estelle, Isabelle, Brigitte F, Brigitte S, Coralie, Vanessa, Virginie, Kevin, Laureline, Valérie, Stéphanie, Olivia, Catherine

A tous mes amis au BIOPOLE

Emilie, Ghislaine, Monique, Brigitte, Anne-sophie, Gabriel, Caroline, Julie,....

A mes amis chinois en France

Yingying WANG, Yihua LIU, Xianglei WU, Qian CAO, Zheng ZHANG, Qian TU, Jie DUAN, Xu YANG, Yong HU, Yueying LI, Song XU, Huili CAI, Kun YANG, Zhen LI, Yun LUO, Wei WANG, Cong BAO, Lin ZHANG, Zhe XIE, Pan DAN, Hao YU, Ganggang ZHANG, Chaojie WEI, Xiaomeng PANG, Chaohua DENG, Feng ZHENG, Min CHEN, Xianqin MAO

A mes amis en Chine

Xin ZHANG, Zixue ZHENG, Xiaoyan XIONG, Dan WU, Dan ZHU, Yan WU, Dai ZHOU, Yan XIONG

SOMMAIRE

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS.....	ix
LISTE DES FIGURES	xi
LISTE DES TABLEAUX.....	xiv
LISTE DES ABREVIATIONS.....	xv
Chapitre I : La leucémie aiguë.....	1
1. Origine et développement dans la moelle.....	1
a) Lymphomagenèse des lymphocytes T et leucémogénèse.....	2
b) Leucémogénèse des lymphocytes B.....	4
c) LAM.....	6
2. Microenvironnement tumoral : interaction avec cellules endothéliales.....	7
Chapitre II : Traitement actuels.....	10
1. Chimiothérapie.....	10
2. Place de la thérapie cellulaire dans les traitements.....	14
a) Avant greffe.....	14
i. Place de l'autogreffe de CSH dans la prise en charge de la LAM.....	15
ii. Essais de traitements par thérapie cellulaire spécifique avant allogreffe: approches d'immunothérapie.....	17
1) Cellules Natural Killer (NK).....	17
2) Lymphocytes T $\gamma\delta$	19
b) L'allogreffe de CSH.....	21
c) Après greffe.....	23
i. Méthode de détection de la rechute.....	23
1) Chimerisme.....	23

2) Maladie résiduelle.....	24
ii. Approches d'immunothérapies.....	25
1) Injections de lymphocytes du donneur (DLI).....	25
2) lymphocytes T cytotoxiques (CTL: cytotoxic T lymphocyte).....	28
i. CTLs spécifiques de mHAg.....	28
ii. CTLs spécifiques de TAA.....	29
3) Cellules T $\gamma\delta$	31
4) Cytokine induced killer (CIK).....	33
i. Généralités.....	34
ii. CIK et post-allogreffe de CSH.....	36
Chapitre III : Cellules NK.....	39
1. Présentation.....	39
a) Généralités.....	39
b) Origine et maturation des cellules NK.....	39
c) Fonctions.....	44
<i>i. Cytotoxicité.....</i>	44
<i>ii. Production de cytokines.....</i>	46
d) Reconnaissance des cellules cibles.....	46
<i>i. Les récepteurs inhibiteurs.....</i>	47
<i>ii. Les récepteurs activateurs.....</i>	47
<i>iii. Spécificité des récepteurs NK.....</i>	47
1) Récepteurs spécifiques du CMH-I.....	48
2) Récepteurs non spécifiques du CMH-I.....	49
<i>iv. Mécanismes d'activation/inhibition.....</i>	50

e)	Alloréactivité des cellules NK dans l'allogreffe de CSH.....	51
2.	Source des cellules souches pour la production de cellules NK.....	54
a)	Cellules NK dérivées du sang périphérique mobilisé et les cellules souches de la MO.....	54
b)	Cellules NK dérivées de cellules souches pluripotentes.....	55
c)	Cellules NK dérivées du sang de cordon.....	56
3.	Méthodes de tri.....	57
4.	Méthodes d'amplification.....	58
a)	Cellules NK activées par des cytokines.....	60
b)	Type de cellules nourricières (feeders).....	62
i.	<i>Cellules NK cultivées en présence de LCL-EBV irradiées.....</i>	63
ii.	<i>Cellules NK élargies en utilisant des PBMC irradiées.....</i>	64
iii.	<i>Cellules NK élargies en utilisant des cellules K562 modifiées génétiquement irradiées.....</i>	65
5.	Cellules NK et essais cliniques.....	67
a)	Cellules NK autologues avec IL-2.....	67
b)	Transfert adoptif de cellules NK allogéniques.....	67
Chapitre IV : Travaux réalisés.....		72
1.	Hypothèse de travail & Objectifs du travail.....	72
2.	Matériels & Méthodes.....	73
3.	Résultats.....	78
Chapitre V : Discussion, conclusions et perspectives.....		103
Bibliographie.....		112
Annexe.....		146

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

PUBLICATIONS

Article 1: (Soumis)

Impaired functions and proliferation of NK cells from patient granulocyte colony-stimulating factor mobilized leukapheresis

Yu Xiong, Loic Reppel, Cécile Pochon, Jean-François Stoltz, Danièle Bensoussan, Véronique Decot

Article 2 :

Immunomodulation of endothelial differentiated mesenchymal stromal cells: impact on T and NK cells

Reine El Omar, **Yu Xiong**, Gabriel Dostert, Huguette Louis, Monique Gentils, Patrick Menu, Jean-François Stoltz, Emilie Velot, Véronique Decot

Immunology and cell biology. 2015. doi: 10.1038/icb.2015.94. [Epub ahead of print]

Revue 1:

Adoptive immunotherapies after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with hematologic malignancies

Yu Xiong, Danièle Bensoussan, Véronique Decot

Transfusion Medicine Reviews. 2015; 29: 259-267.

Revue 2:

IL-15 as a potential target in leukemia

Yu Xiong, Danièle Bensoussan, Véronique Decot

Blood and Lymphatic Cancer: Targets and Therapy. 2015; 5: 55-63.

COMMUNICATIONS

- Journée d'Echanges sur la Recherche en Cancérologie en Lorraine La personnalisation du diagnostic et des traitements – 2014 – Communication orale.
- Colloque 18^{èmes} Journées Jeunes Chercheurs de la fondation ARC pour la recherche sur le cancer – 2014 – poster
- 15^{èmes} Journées du Groupe de Pharmacologie Clinique Oncologique – 2014 – poster
- 15^{èmes} Congrès de la Société Française de Greffe de Moelle et de Thérapie Cellulaire– 2015 – poster

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Altérations (épi) génomiques dans la leucémie aiguë.....	1
Figure 2. Le développement de thymocyte.....	3
Figure 3. Mécanismes impliqués dans le maintien des CSHs et des LICs au sein des niches ostéoblastiques et vasculaires.....	9
Figure 4. Les estimations de Kaplan-Meier de la survie globale des patients LAM à risque intermédiaire dans RC1, l'âge de 40 à 60 ans, selon le type de thérapie post remission (mise à jour les résultats de Cornelissen <i>et al</i> 2016) envisagé.....	16
Figure 5. Récepteurs de cellules T $\gamma\delta$	20
Figure 6. Procédure pour la préparation de CIK.....	38
Figure 7. Origine des cellules NK.....	42
Figure 8. Production des cellules NK <i>ex vivo</i>	42
Figure 9. Schéma des sous-populations de cellules NK humaines.....	43
Figure 10. Activation de cellules NK.....	45
Figure 11. Récepteurs de surface des cellules NK et leurs ligands.....	50
Figure 12. Régulation de la réponse des cellules NK par les récepteurs activateurs et inhibiteurs.....	51
Figure 13. Les cellules NK de grade clinique sont généralement issues de produits d'aphérèse frais ou congelés.....	59
Figure 14. Stratégies pour activer et/ou d'étendre les cellules NK pour perfusion adoptive chez les humains atteints de cancer	60
Figure 15. Amplification de cellules NK.....	79
Figure 16. Ratio d'expansion des cellules NK.....	81
Figure 17A. Impact de la culture en présence d'IL15 et d'IL15 plus des billes couplées à anti-	

CD335 et anti-CD2 sur le phénotype membranaire des cellules NK issues de sang de témoins (n = 3).....	83
Figure 17B. Impact de la culture en présence d'IL15 et d'IL15 plus des billes couplées à anti-CD335 et anti-CD2 sur le phénotype membranaire des cellules NK issues de CSP de donneurs sains (n = 3).....	84
Figure 17C. Impact de la culture en présence d'IL15 et d'IL15 plus des billes couplées à anti-CD335 et anti-CD2 sur le phénotype membranaire des cellules NK issues de CSP de patients (n = 3).....	85
Figure 18A. Impact du statut entre le sang de témoins, les CSPs mobilisées de donneurs sains (CSPs saines) et de patients (CSPs de patients) sur l'expression des récepteurs des cellules NK cultivées en présence d'IL-15 (n = 3).....	88
Figure 18B. Impact du statut entre le sang de témoins, les CSPs mobilisées de donneurs sains (CSPs saines) et de patients (CSPs de patients) sur l'expression des récepteurs des cellules NK cultivées en présence d'IL-15 et de billes (n = 3).....	89
Figure 19A. Cytotoxicité après l'amplification. Comparaison entre l'IL15 et l'IL15 plus des billes couplées à anti-CD335 et anti-CD2 pour les cellules NK issues de sang de témoins (n = 3).....	91
Figure 19B. Cytotoxicité après l'amplification. Comparaison entre l'IL15 et l'IL15 plus des billes couplées à anti-CD335 et anti-CD2 pour les cellules NK issues de CSP de donneurs sains (n = 3).....	91
Figure 19C. Cytotoxicité après l'amplification. Comparaison entre l'IL15 et l'IL15 plus des billes couplées à anti-CD335 et anti-CD2 pour les cellules NK issues de CSP de patients (n = 3).....	92
Figure 19D. Cytotoxicité après l'amplification. Comparaison d'impact du statut entre les	

témoins, les CSPs mobilisées de donneurs sains et de patients en présence d'IL-15 (n = 3)..	92
Figure 19E. Cytotoxicité après l'amplification. Comparaison d'impact du statut entre les témoins, les CSPs mobilisées de donneurs sains et de patients en présence d'IL-15 plus des billes couplées à anti-CD335 et anti-CD2 (n = 3).....	93
Figure 20. Analyse par cytométrie en flux des sous-populations en fonction de l'expression du CD56 et du CD16 selon l'origine des cellules NK au jour 0 (J0), 7 (J7), 10 (J10), et 14 (J14) de la culture.....	96
Figure 21. Changements dans les profils d'expression des récepteurs NKG2D, KIR2DL1, KIR2DL3, KIR2DL5 et CD137 sur les cellules NK CD56 ^{bright} CD16 ⁻ (A) ou CD56 ^{bright} CD16 ⁺ (B) pendant 14 jours de culture.....	99
Figure 22. (A) Pourcentage de cytotoxicité de cellules NK de différentes origines envers les cellules K562, après 14 jours de culture. (B) Profil de sécrétion des cytokines des cellules NK d'origines différentes au jour 7, 10 et 14 au cours de la culture cellulaire.....	101
Figure 23. Moment de l'immunothérapie dans le cadre de la progression de la leucémie.....	103

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Agents actuellement en essais cliniques combinés avec le régime anthracycline/cytarabine pour les patients leucémie aiguë myéloïde nouvellement diagnostiqué.....	13
Tableau 2. Rapports publiés sur l'utilisation de DLI comme la prophylaxie ou le traitement après greffe de CSH.....	27
Tableau 3. Méthodes pour isoler, activer et expandre des cellules pour les immunothérapies adoptives après greffe de CSH.....	30
Tableau 4. Interleukines clés et leurs rôles en ce qui concerne les cellules NK.....	62
Tableau 5. Résultats des études portant sur immunothérapie adoptive de cellules NK après greffe de CSH.....	69
Tableau 6a. Ratio d'expression des différents récepteurs entre J0 et J14 en fonction des 2 conditions de culture pour les cellules NK issues de sang de témoins (n = 3).....	83
Tableau 6b. Ratio d'expression des différents récepteurs entre J0 et J14 en fonction des 2 conditions de culture pour les cellules NK issues de CSP de donneurs sains (n = 3).....	84
Tableau 6c. Ratio d'expression des différents récepteurs entre J0 et J14 en fonction des 2 conditions de culture pour les cellules NK issues de CSP de patients (n = 3).....	85

LISTE DES ABREVIATIONS

ADCC :	Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity
ADN :	Acide DésoxyriboNucléique
ARN :	Acide RiboNucléique
BDR :	bulk dosing regimen
BiKEs :	bispecific killer engagers
cAMP :	cyclic adenosine monophosphate (adénosine monophosphate cyclique)
CAR :	chimeric antigen receptor (récepteurs d'antigènes chimériques)
Cen :	centromérique
CIK :	cytokine induced killer
CLP :	common lymphoid progenitor (progéniteurs lymphoïdes communs)
CM :	chimérisme mixte
CMH :	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMN :	cellule mononucléée
CNS :	<i>central nervous system</i> (système nerveux central)
CPA :	cellule présentatrice d'antigène
CSH :	cellule souche hématopoïétique
CSM :	cellule stromale mésenchymateuse
CSP :	cellule souche périphérique
CT :	chimérisme total
CTL :	cytotoxic T lymphocyte (lymphocyte T cytotoxique)
CTLA-4 :	cytotoxic-T-lymphocyte-associated-antigen-4
CXCL :	C-X-C motif chemokine ligand
DC :	dendritic cell (cellule dendritique)

DFS :	disease-free survival (survie prolongée sans maladie)
DLI :	donor lymphocyte infusion (injection de lymphocytes du donneur)
EDTA :	ethylene diamine tetraacetic acid
ESD :	escalated dosing regimen
Fab :	fragment of antigen-binding (fragment de liaison d'antigène)
FITC :	Fluorescein isothiocyanate
FLT3	Fms-like tyrosine kinase 3
Foxp3 :	forkhead box P3 (boîte de forkhead P3)
G-CSF :	Granulocyte-colony stimulating factor (facteur de stimulation des colonies de granulocytes)
GFP:	green fluorescent protein (protéine fluorescent verte)
GITR :	glucocorticoid induced tumor necrosis factor receptor
GMP :	Good Manufacturing Practice
GVH :	Graft- <i>versus</i> -Host (Greffon contre l'hôte)
GVHD :	Graft- <i>versus</i> -Host Disease (Réaction du greffon contre l'hôte)
GVHDa :	acute Graft- <i>versus</i> -Host Disease (Réaction du greffon contre l'hôte aiguë)
GVHDc :	chronic Graft- <i>versus</i> -Host Disease (Réaction du greffon contre l'hôte chronique)
GVL :	Graft- <i>versus</i> -Leukemia (greffon contre la leucémie)
GVT :	Graft- <i>versus</i> -Tumor (greffon contre la tumeur)
hESCs :	human embryonic stem cells (cellules souches embryonnaires humaines)
HLA :	Human Leukocyte Antigen
iAMP :	intrachromosomique du chromosome
IFN- γ :	Interféron gamma
IGH	immunoglobulin heavy chain (immunoglobuline de chaîne lourde)

IL :	Interleukine
iPSCs :	induced pluripotent stem cells (cellules souches pluripotentes induites)
KIR :	Killer cell Ig-like Receptors
LAK :	lymphokine-activated killer
LAL :	leucémie aiguë lymphoblastique
LAM :	leucémie aiguë myéloïde
LepR ⁺	récepteur de la leptine positif
LFS :	leukemia-free survival
LH :	lymphome de Hodgkin
LICs :	leukemia initiating cells (leucémie cellules initiatrices)
LIF :	leukemia inhibitory factor (facteur inhibiteur de la leucémie)
LMC :	leucémie myéloïde chronique
LNH :	lymphome non Hodgkinien
mAbs :	anticorps monoclonaux
MAC :	conventional myeloablative conditioning (conditionnement myéloablatif classique)
MDS :	myélodysplasie
mHAg :	antigènes mineurs d'histocompatibilité
MM :	myélome multiple
MMP :	matrix metalloprotein
MMRD :	mismatched related donor (donneur apparenté dépareillés)
MMUD :	mismatched unrelated donor (donneur non apparenté dépareillés)
MO :	moelle osseuse
MoR :	rémission moléculaire

MRD :	minimal residual disease (maladie résiduelle minimale)
MRD :	matched related donor (donneur apparenté appariés)
MSD :	matched sibling donor (donneur appariés de frère)
MSL :	milieu de séparation des lymphocytes
MUD :	mathed unrelated donor (donneur non apparenté appariés)
NAM :	nicotinamide
NCR :	natural cytotoxicity receptors
NES ⁺	nestine-positives
NK :	natural killer
NMA :	conditionnement non myéloablatifs
No.	nombre de patients
NPM:	nucléophosmine
NR :	not reported (pas signalé)
NRM :	non-relapse mortality (mortalité non-rechute)
ORR :	objective response rate (taux de réponse objective)
OS :	overall survival (survie globale)
PBMC :	peripheral blood mononuclear cell
PBS :	phosphate buffered saline
PBSC :	peripheral blood stem cell
PCR :	polymerase chain reaction
PD-1 :	programmed cell death 1 (mort cellulaire programmée 1)
pDLI :	DLI prophylactique
PE :	Phycoerythrin
PFS :	progression-free survival

RC :	rémission complète
RIC :	reduced intensity conditioning (conditionné de l'intensité réduit)
RP :	rémission partielle
SAB :	sérum albumine
SCF :	stem cell factor (facteur des cellules souches)
SVF :	sérum de veau foetal
TCD :	T-cell depleted (déplétion des cellules T)
Tcon	cellule T conventionnelle
TCR :	T cell receptor (récepteur des cellules T)
tDLI :	DLI thérapeutique
Tel :	télomérique
TGF β :	transforming growth factor β
Th1 :	T helper 1
TiKEs :	trispécific killer engagers
TIL :	tumor infiltrating lymphocytes (lymphocytes infiltrant les tumeurs)
TNF- α :	tumor necrosis factor alpha
Treg :	regulatory T cell (lymphocyte T régulateur)
TRM :	treatment-related mortality (mortalité liée au traitement)
UCB :	<i>umbilical cord blood</i> (sang de cordon ombilical)
URD :	unrelated donor (donneur non apparenté)
WT1 :	gène 1 de la tumeur de Wilms

Chapitre I : La leucémie aiguë

1. Origine et développement dans la moelle

Les leucémies aiguës sont caractérisées par une prolifération de cellules hématopoïétiques immatures prenant son point de départ dans la moelle osseuse (MO) et envahissant le sang périphérique puis au cours de l'évolution, tous les organes. Cette prolifération s'accompagne d'une insuffisance de production par la MO des éléments normaux du sang. En fonction de la lignée cellulaire atteinte, les leucémies aiguës sont classées en leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) et leucémies aiguës myéloblastiques (LAM). Des recherches intensives ces deux dernières décennies, ont fourni des preuves convaincantes que la leucémie aiguë est le produit d'un processus en plusieurs étapes associées à l'acquisition de multiples altérations génétiques qui ont été fonctionnellement classées en deux grandes catégories (Figure 1) (Chalandon et Schwaller, 2005).

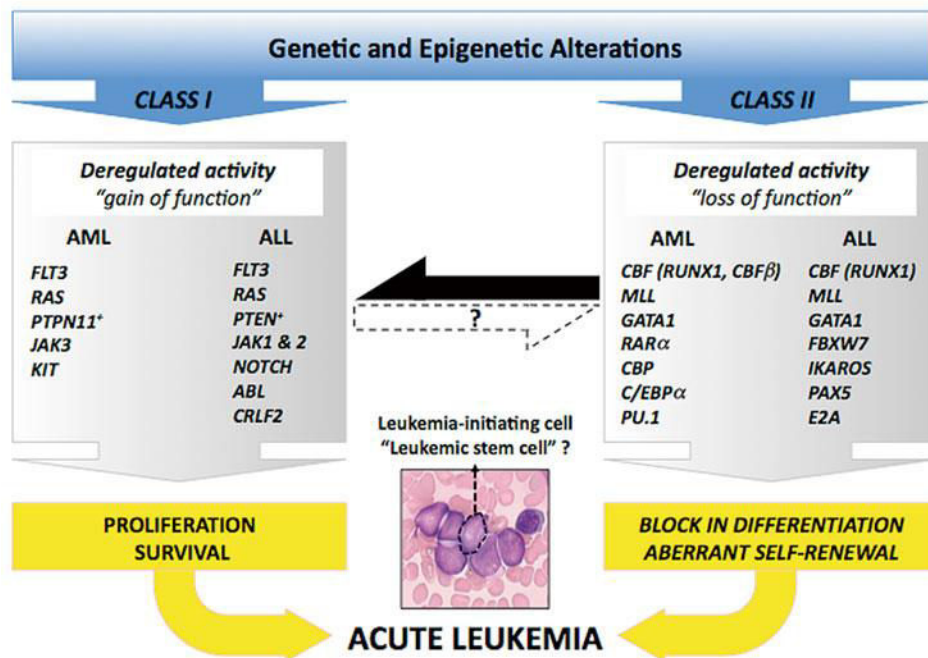


Figure 1. Altérations (épi)génomiques dans la leucémie aiguë. Les altérations de «classe I» ont une activité aberrante conduisant à la prolifération et la survie de cellules alors que les modifications de «classe II»

entraînent un blocage dans le processus de différenciation et un auto-renouvellement aberrant. Les flèches noires et pointillées représentent l'existant et putative diaphonies entre les différentes mutations de classe respectivement (Stavropoulou *et al.*, 2010).

La LAL est un trouble malin qui provient d'un seul précurseur hématopoïétique à l'origine de la lignée de cellules B ou T. L'acquisition par le précurseur d'une série d'anomalies génétiques perturbe le processus de maturation normale, ce qui conduit à un arrêt de la différenciation et à la prolifération de la cellule transformée. En conséquence, il y a accumulation de B immatures ou d'un clone de cellules T dans la MO qui entraîne la suppression de l'hématopoïèse normale. Quatre-vingt à 85% de LAL sont de la lignée de cellules B (cellule B précurseur LAL, LAL-BCP), et 15 - 20% sont de la lignée de cellules T (LAL-T) (Graux, 2011).

a) Lymphomagenèse des lymphocytes T et leucémogénèse

Lorsque des progéniteurs lymphoïdes communs (CLP: common lymphoid progenitor) entrent dans le thymus, ils reçoivent des signaux en provenance du microenvironnement thymique, en les engageant définitivement dans la lignée de lymphocytes T. Les lymphocytes immatures engagés, appelés thymocytes, subissent deux étapes essentielles: l'acquisition d'un récepteur de cellules T matures unique (TCR: T-cell receptor) suit le réarrangement des gènes codant pour les différentes chaînes du récepteur, et une étape de sélection qui ne retiendra que les thymocytes avec un récepteur fonctionnel, capable de reconnaître des antigènes spécifiques présentés par les cellules épithéliales thymiques par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Les thymocytes reçoivent des signaux provenant du TCR fonctionnel qui sont transmis aux noyaux par différentes protéines de signalisation, initiant la transcription des gènes de survie. Les protéines de signalisation activées peuvent être des tyrosine kinases telles que la LCK, ABL1, . . . (Graux *et al.*, 2006).

Le développement des thymocytes est régi par une série de facteurs de transcription et des régulateurs de l'hématopoïèse tels que les protéines E2A. D'autres protéines telles que les protéines de la famille des protéines NOTCH, des protéines HOX, MYB, IKAROS jouent un rôle dans l'attachement des cellules T, la différenciation et la prolifération. Les protéines NOTCH jouent également un rôle important dans l'auto-renouvellement des progéniteurs (Murre, 2000) (Figure 2).

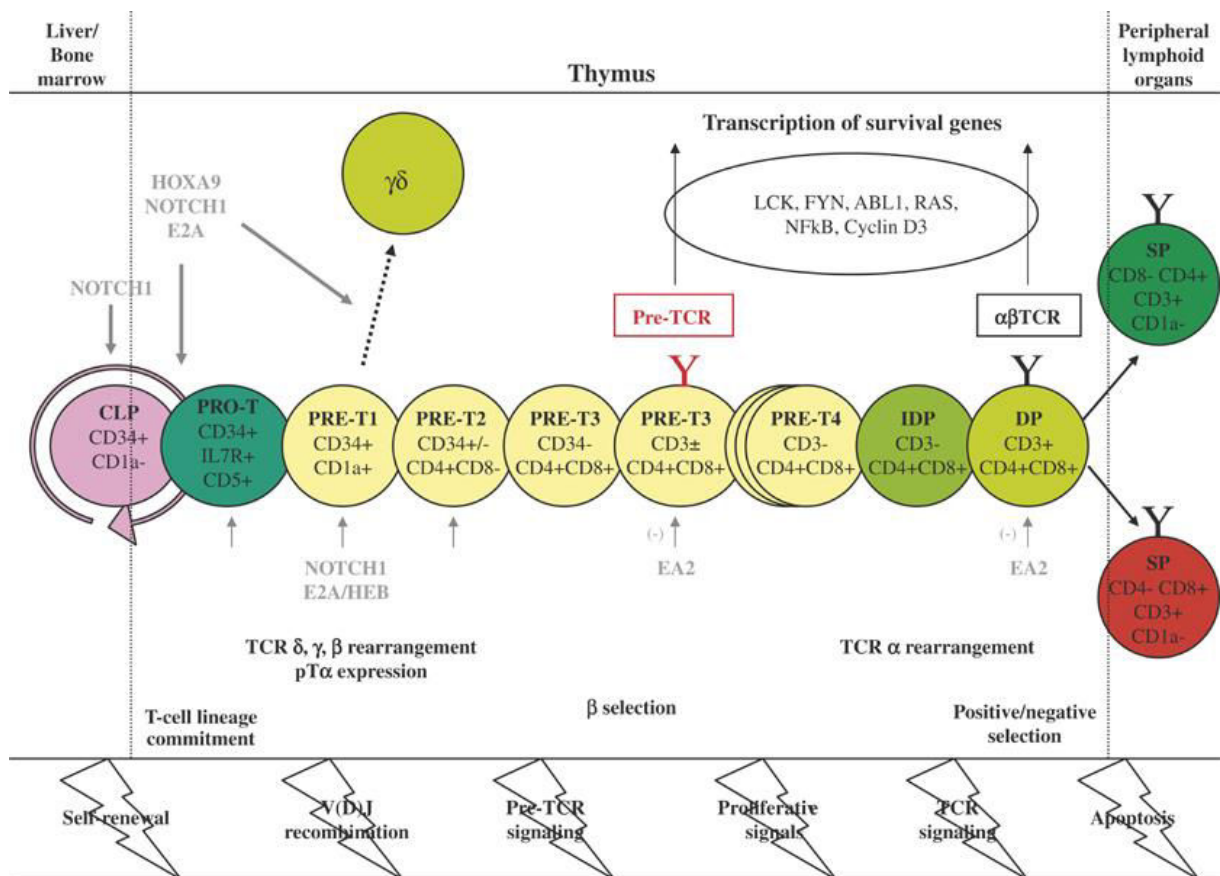


Figure 2. Le développement de thymocyte. CLP: progéniteur lymphoïde commun; IDP: immature à double thymocytes positif; DP: CD8+ CD4+ double thymocytes positif; SP: CD4+ ou CD8+ simple thymocytes positif; pTα: chaîne TCRα «substitut» pour les cellules T immatures; pré-TCR: récepteur des pré-cellules T. La partie inférieure de la figure résume les étapes critiques du développement des thymocytes qui peuvent être ciblées par des événements oncogéniques (Graux *et al.*, 2006).

Dans LAL-T, des altérations de ces protéines clés sont communément responsables de la transformation leucémique. Au moment où a lieu le réarrangement des différents (V), (D) et (J), des gènes du TCR, des recombinaisons illégitimes entre les promoteurs des gènes du TCR gènes éléments des récepteurs du promoteur et des gènes qui se trouvent dans une conformation ouverte à ce stade de développement des cellules T peuvent se produire. Par conséquent, des translocations entre TCR et des gènes HOX (TLX1, TLX3, HOXA), ou des gènes codant pour des protéines qui interagissent avec E2A (TAL1, TAL2, LMO1, LMO2, LYL1) sont retrouvées actuellement dans LAL-T (Graux *et al.*, 2006). En outre, des mutations activatrices de NOTCH1 sont retrouvées dans plus de 50% des cellules ayant une capacité d'auto-renouvellement anormale, tandis que l'inactivation de CDKN2A (p16) par délétion chromosomique est couramment retrouvée lors du diagnostic primaire de LAL-T (Weng *et al.*, 2004; Sulong *et al.*, 2009).

Une autre constatation récurrente dans LAL-T est l'activation constitutive de la signalisation en aval du TCR, indépendamment de la rencontre avec l'antigène, mais à la suite des mutations de gènes codant pour des tyrosine kinases tels que ABL1, LCK et d'autres joueurs tels que RAS. Alternativement, la suppression de gènes codant pour des régulateurs négatifs de la signalisation cellulaire telle que la phosphatase PTEN conduit à la transcription constitutive de gènes de survie (Burnett *et al.*, 1994; Graux *et al.*, 2004; Palomero *et al.*, 2007).

b) Leucémogénèse des lymphocytes B

LAL-BCP est une maladie cliniquement et biologiquement hétérogène résultant de l'accumulation d'altérations génétiques dans les cellules précurseurs lymphoïdes B et

représente la maladie maligne la plus fréquente chez l'enfant (Pui *et al.*, 2004; Mullighan *et al.*, 2007).

Environ 75% des cas LAL-BCP hébergent une altération chromosomique récurrente détectable par des approches cytogénétiques classiques (Mullighan, 2012). Des changements semblables se retrouvent chez les adultes et les enfants, mais avec une distribution de fréquence différente (Harrison et Feroni, 2002). Dans la LAL-BCP, les altérations caractéristiques sont divisées en des aberrations numériques, telles que hyperdiploïdie et hypodiploïdie, et des modifications structurales, y compris des réarrangements chromosomiques entraînant les translocations t (12; 21) (p13; q22) ETV6-RUNX1, t (1; 19) (q23; p13) TCF3-PBX1, et t (9; 22) (q34; q11,2) BCR-ABL1, ainsi que des fusions de KMT2A (MLL) à 11q23 avec un ensemble diversifié de partenaires de fusion (Harrison et Feroni, 2002; Pui *et al.*, 2004).

Bien que ces réarrangements soient des événements critiques initiateurs dans leucémogénèse, ils sont insuffisants pour induire une leucémie manifeste, indiquant que les lésions génétiques coopérantes supplémentaires sont nécessaires. L'analyse du nombre de copies d'acide désoxyribonucléique (ADN) et les technologies de séquençage de nouvelle génération récemment mis au point, telles que le séquençage ciblé, le séquençage de l'exome, le séquençage du transcriptome, et le séquençage du génome entier, ont permis d'accroître le nombre de lésions trouvées dans la LAL-BCP. Cela a abouti à la découverte de nombreuses mutations dans les gènes de la voie clé dans la LAL-BCP et l'identification de nouveaux sous-types de LAL-BCP tels que la LAL BCR-ABL1-like, la LAL-BCP-avec amplification intrachromosomique du chromosome 21 (iAMP21), locus d'immunoglobuline de chaîne lourde (IGH)- et cytokine récepteur-like facteur 2 (CRLF2)-réarrangée LAL, gène apparenté

ETS (ERG)-déréglementé LAL, jumelé boîte gène homéotique 5 (PAX5)-réarrangée LAL, et la famille IKAROS doigt de zinc 1 (IKZF1)-déréglementé LAL (Roberts et Mullighan, 2015).

c) LAM

La LAM est une maladie maligne clonale caractérisée par l'accumulation de cellules myéloïdes immatures et une incapacité de la MO pour produire des quantités suffisantes de cellules sanguines matures (Swerdlow *et al.*, 2008). La LAM est la leucémie aiguë la plus courante chez les adultes. C'est une maladie hétérogène et ces dernières décennies, les progrès de la méthodologie de séquençage ont révélé un schéma complexe de combinaisons de différentes aberrations génétiques (Ley *et al.*, 2013). Les sous-groupes génétiques de la LAM ont jusqu'à présent été principalement basés sur le caryotype conventionnel, qui permettent de détecter les aberrations génétiques plus grandes, telles que les translocations chromosomiques (par exemple, t (8; 21), t (15; 17), translocations MLL et la perte et de gain de matériel génétique (par exemple, monosomies et trisomies ainsi que 7q- et 5q-) (Dohner *et al.*, 2010; Marcucci *et al.*, 2011).

Auparavant, un modèle largement accepté pour LAM était le «modèle à deux touchés : two-hit model», dans lequel le développement de la LAM exigeait des mutations dans deux types de gènes (mutations de classe I et II) (Kelly et Gilliland, 2002; Shih *et al.*, 2012). Les mutations de classe I sont des mutations des gènes contrôlant la prolifération cellulaire et l'apoptose, telles que les gènes de tyrosine kinases (par exemple, Fms-like tyrosine kinase 3 (FLT3), RAS, KIT et BCR-ABL). Les mutations de classe II ont été associées à un blocage de la maturation due à des aberrations génétiques dans les facteurs de transcription qui favorisent normalement la différenciation cellulaire au cours des étapes cruciales de l'hématopoïèse myéloïde. Ces événements génétiques de classe II incluent les gènes de fusion RUNX1/

RUNX1T1 et CBFβ/MYH11, ainsi que des mutations dans CEBPA et RUNX1 et les aberrations MLL. Bien que ces mutations classiques restent des événements clés en matière de LAM, les analyses utilisant la nouvelle génération de techniques de séquençage ont identifié de nouvelles aberrations génétiques qui jettent une lumière nouvelle sur la leucémogénèse dans la LAM (Ley *et al.*, 2013). Dans ce nouveau modèle de LAM, des mutations dans les gènes qui régulent les modèles épigénétiques jouent un rôle de premier plan (Shih *et al.*, 2012; Ley *et al.*, 2013). Les aberrations épigénétiques peuvent être impliquées soit dans la régulation de méthylation de l'ADN (tels que des mutations dans DNMT3A, TET2, IDH1 et IDH2) ou dans d'autres types de mécanismes de régulation de la chromatine et les modifications des histones (fusions MLL, MLL-PTD, et des mutations dans ASXL1 et EZH2) (Abdel-Wahab et Levine, 2013; Mehdipour *et al.*, 2015).

2. Microenvironnement tumoral: interaction avec cellules endothéliales

En 1978, Schofield a proposé que les cellules souches hématopoïétiques (CSH) saines résident dans une niche de la MO où elles sont protégées contre les contraintes environnementales et reçoivent un soutien adéquat pour maintenir leur auto-renouvellement et leur capacité de différenciation multi-lignée. Les niches sont des zones spécialisées de la MO constituées de différents types de cellules qui contrôlent le nombre, la quiescence, l'auto-renouvellement, la prolifération, la différenciation et la localisation de CSH (Figure 3) (Schofield, 1978).

Deux niches médullaires distinctes ont été identifiées, dénommées les niches «endostéale» et «vasculaire» (Mendelson et Frenette, 2014; Morrison et Scadden, 2014). La niche endostéale, qui est localisée au niveau de l'endosteum, comprend les ostéoblastes, les ostéoclastes, les cellules de Schwann et les cellules T régulatrices (Tregs), tandis que la niche

vasculaire, localisée au niveau des parois sinusoïdales, est composée de chimiokines à motif CXC (CXCL) 12, des cellules abondantes réticulaires, des cellules endothéliales, des cellules stromales mésenchymateuses (CSM) nestine-positives (NES⁺) et des cellules stromales périvasculaires exprimant le récepteur de la leptine [LepR⁽⁺⁾] (Tabe et Konopleva, 2014) (Figure 3). Ces cellules régulent les propriétés des CSH à travers une myriade de signaux différents, y compris des cytokines, des chimiokines et des molécules d'adhésion.

La chimiorésistance et la rechute des leucémies aiguës sont soupçonnées d'être entraînées par un pool de rares cellules initiatrices de la leucémie (LICs: leukemia initiating cells) (Bonnet et Dick, 1997). Comme les CSHs saines, les LICs dépendent de signaux provenant du microenvironnement médullaire pour leur survie et leur prolifération (Duhrsen et Hossfeld, 1996). Néanmoins, les LICs peuvent concurrencer les CSHs, détournant ainsi les niches du microenvironnement médullaire (Colmone *et al.*, 2008). En d'autres termes, les cellules leucémiques perturbent les niches médullaires saines et créent des niches «leucémiques». En effet, les cellules leucémiques, en libérant exosomes/microvésicules, induisent des changements dans le microenvironnement médullaire, qui est reprogrammé pour soutenir la persistance leucémique (Huan *et al.*, 2013). Huan *et al* ont observés que des exosomes isolés à partir de cellules de LAM sont enrichis en ARN codants et non codants relevant de la pathogénèse de la leucémie aigue: FLT3, nucléophosmine 1 (NPM1), CXCR4, matrix metalloprotein-9 (MMP-9), et de l'insulin-like growth factor 1 receptor (IGF-1R) et capables d'altérer les capacités sécrétrices, migratoires et angiogéniques des cellules stromales. Cette étude suggère que les exosomes de cellules leucémiques sont capables de reprogrammer le microenvironnement médullaire pendant l'invasion (Huan *et al.*, 2013).

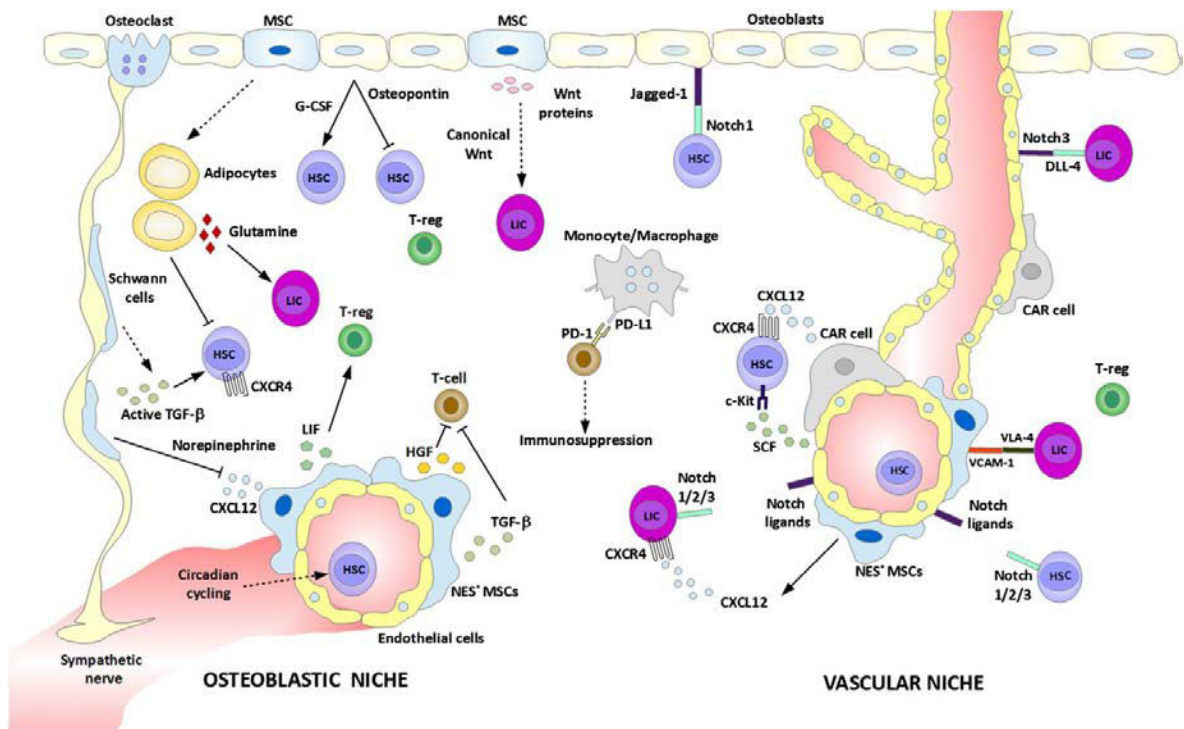


Figure 3. Mécanismes impliqués dans le maintien des CSHs et des LICs au sein des niches ostéoblastiques et vasculaires. La niche ostéoblastique est principalement impliquée dans le maintien de la quiescence de cellules souches hématopoïétiques (CSHs), tandis que la niche vasculaire favorise vraisemblablement la prolifération, la différenciation, et la mobilisation de CSHs. Les ostéoblastes sont capables à la fois soutenir et réguler négativement la prolifération des CSHs, via facteurs de stimulation tel que le G-CSF (Granulocyte-colony stimulating factor), Jagged-1/Notch1, et la signalisation de l'ostéopontine. L'état dormant des CSHs est régulé par le transforming growth factor β (TGF- β), dont l'activation est régulée par des cellules de Schwann non-myélinisantes. LICs: leukemia initiating cells. (Chiarini *et al.*, 2016).

Chapitre II : Traitement actuels

1. Chimiothérapie

Le traitement pour la LAL est classé au sens large comme la phase d'induction, le traitement de consolidation, le traitement d'entretien, la prophylaxie du système nerveux central (CNS: central nervous system), et la greffe de cellules souches allogéniques.

Les piliers de la thérapie d'induction sont la vincristine, anthracyclines, corticostéroïdes et L-asparaginase bien que cette dernière est peut-être sous-utilisée chez les adultes en raison d'une moins bonne tolérance. Chez les enfants, il existe des preuves convaincantes pour l'inclusion de la L-asparaginase pendant l'induction et les phases post-rémission. La situation chez les adultes est moins clair, cependant, l'absence de L-asparaginase de l'un des régimes couramment utilisés (hyper-CVAD) ne semble pas avoir un impact négatif sur la survie (Kantarjian *et al.*, 2004). La disponibilité de l'asparaginase pégylée a amélioré la tolérance chez les adultes ayant une demi-vie sérique plus longue et un risque réduit d'hypersensibilité.

La phase post-rémission (consolidation ou intensification) implique généralement une série complexe de traitements cytotoxiques, y compris la cytarabine, le méthotrexate à haute dose par voie intraveineuse et le cyclophosphamide. Le principe général, que l'intensification significative post-induction améliore les résultats, semble être vrai dans toutes les études de traitement chez les enfants (Brown *et al.*, 2012).

Le traitement des adultes atteints de LAL présente également deux autres caractéristiques la nécessité d'une prophylaxie au niveau du CNS et d'une chimiothérapie d'entretien prolongée. Sans la prophylaxie du CNS, les taux de rechute au niveau du CNS sont de 30 - 50% (Surapaneni *et al.*, 2002). L'incorporation de mesures spécifiques telles que l'irradiation crânienne, la chimiothérapie intrathécale et des protocoles de chimiothérapie systémiques qui

comprennent des agents avec pénétration dans le CNS, tels que la dexaméthasone, le méthotrexate à haute dose et la cytarabine à haute dose ont été démontrés comme réduisant sensiblement cette complication (Rabin *et al.*, 2011). Bien que l'irradiation crânienne soit toujours incluse dans certains protocoles, cette approche thérapeutique tend à être supplantée par des régimes à base de médicaments en raison de la morbidité liée à la radiothérapie associée à la neurotoxicité aiguë et les déficits neurocognitifs à long terme. Le traitement d'entretien est une caractéristique unique de traitement de LAL et se compose de 2 à 3 ans de traitement post-consolidation, habituellement administré par voie orale avec des antimétabolites. Un régime d'entretien couramment utilisé est le méthotrexate hebdomadaire par voie orale et la mercaptopurine quotidienne, bien que d'autres schémas thérapeutiques comprennent la thioguanine, la vincristine et la dexaméthasone (Faderl *et al.*, 2010).

La base du traitement initial pour la LAM, comprenant une combinaison de cytarabine et d'anthracycline, a été développée à l'origine dans les années 1960 (Yates *et al.*, 1973). Malgré des décennies d'essais cliniques, l'efficacité de cette combinaison, bien que loin d'être optimale, reste inégalée. Il continue d'y avoir de nombreuses itérations du régime «7 + 3», nommé pour 7 jours de cytarabine et 3 jours d'anthracycline, avec des modifications dans les doses des deux agents et dans le type d'anthracycline.

Des études sont en cours pour améliorer le régime «7 + 3» à la fois pour les patients nouvellement diagnostiqués et récidivant/réfractaire de la LAM en ajoutant des agents classiques et nouveaux. Un essai randomisé publié récemment mené par le Groupe de la leucémie aiguë polonaise sur 652 patients atteints de LAM nouvellement diagnostiqués de moins de 60 ans a montré que l'ajout de cladribine à la daunorubicine 60 mg/m² jours 1-3 et à la cytarabine 200 mg/m² 1-7 jours produits des taux plus élevés de rémission complète (RC) et la survie globale (OS: overall survival), avec 45 ± 4% à 3 ans pour les patients qui ont reçu

la cladribine, par rapport à $33 \pm 4\%$ ($p = 0,02$ pour la daunorubicine/cytarabine) (Holowiecki *et al.*, 2012). La Clofarabine, un autre analogue de la purine structurellement apparenté à la cladribine, a démontré son activité dans la LAM et entraîné une amélioration des taux de RC et l'OS lorsqu'elle est combinée avec la cytarabine à faible dose chez les patients âgés atteints de LAM (Faderl *et al.*, 2008; Burnett *et al.*, 2010; Kantarjian *et al.*, 2010). Il y a un actuellement un essai clinique en cours comparant la clofarabine par rapport à la combinaison daunorubicine et cytarabine aux Etats-Unis dirigée par l'ECOG ([https://clinicaltrials.gov.NCT01041703](https://clinicaltrials.gov/NCT01041703)), et dans un essai européen la clofarabine est combinée avec la daunorubicine et cytarabine ([https://clinicaltrials.gov.NCT01534702](https://clinicaltrials.gov/NCT01534702)). En outre des analogues de purine, de nombreux autres agents sont actuellement associés à la combinaison «7 + 3» dans des essais cliniques (Tableau 1) (<http://www.clinicaltrials.gov>). Plusieurs sont également à l'étude dans le traitement de la rechute ou la LAM réfractaire, des agents utilisés seuls ou en combinaison avec des régimes standard, par exemple, mitoxantrone-étoposide-cytarabine; fludarabine-cytarabine-G-CSF ou encore la cladribine-la cytarabine-G-CSF.

Des efforts sont en cours pour améliorer et optimiser la libération et la tolérabilité de la cytarabine et les anthracyclines. L'elacytarabine, actuellement en test dans un essai randomisé pour les patients atteints de LAM en rechute, est une forme conjuguée de la cytarabine à l'acide élaïdique, ce qui permet le contournement du transporteur de nucléosides hENT1 (<http://clinicaltrials.gov/NCT01147939>). Une autre nouvelle formulation, CPX-351 (Celator Pharmaceuticals, Princeton, New Jersey, États-Unis), est un transporteur liposomal contenant de la cytarabine et la daunorubicine dans un rapport fixe 5 : 1 molaire. La sécurité et l'efficacité préliminaire ont été démontrées chez les patients atteints de LAM en rechute (Feldman *et al.*, 2011) et un essai randomisé *versus* l'association daunorubicine et cytarabine conventionnelle est l'ouvert pour les patients âgés nouvellement diagnostiqués LAM

(Feldman *et al.*, 2011). Le vosaroxin (Sunesis Pharmaceuticals, South San Francisco, Californie, États-Unis), un dérivé de quinolone anticancéreux, inhibiteur de la topoisomérase. Il ayant un profil de toxicité extramédullaire favorable (Lancet *et al.*, 2011) est actuellement en cours d'essai dans la LAM en rechute (<http://clinicaltrials.gov/NCT01191801>).

Tableau 1. Agents actuellement en essais cliniques combinés avec le régime anthracycline/cytarabine pour les patients atteints de leucémie aiguë myéloïde nouvellement diagnostiquée (Roboz, 2012).

Class	Agent
Hypomethylators	Decitabine, azacitidine
Immunomodulator	Lenalidomide
mTOR pathway inhibitor	Temsirolimus
Histone deacetylase inhibitors	Panobinostat, vorinostat
FLT3 inhibitors	AC-220, sorafenib, midostaurin
BCR-ABL/SRC inhibitor	Dasatinib
Antibody conjugate	Gemtuzumab ozogamicin
Retinoid	All-trans retinoic acid
Cyclin-dependent kinase inhibitor	Flavopiridol
Hedgehog inhibitor	PF-04449913

BCR-ABL/SRC, breakpoint cluster region-abl tyrosine kinase/v-src sarcoma viral oncogene; FLT3, FML-like tyrosine kinase 3; mTOR, mammalian target of rapamycin. Données provenant de ClinicalTrials.gov.

Les stratégies chimiothérapeutiques sont limitées par deux questions principales, la toxicité et le manque d'efficacité/résistance (pour certaines leucémies). Cependant, l'application de chimiothérapies cytotoxiques avec/sans allogreffe de CSH reste le pilier du traitement médical des tumeurs solides et de la leucémie (Steinchen *et al.*, 2012; Guo et Huang, 2014). Les chimiothérapies traditionnelles agissent préférentiellement sur les cellules cancéreuses, en fonction de leur nature à se diviser rapidement. La daunorubicine et la cytarabine forment l'épine dorsale de la plupart des traitements de la LAM. Les anthracyclines telles que la daunorubicine inhiber la synthèse de l'ADN, l'activation d'histone

et interfèrent avec la topoisomérase II - un important régulateur du super-enroulement de l'ADN. La cytarabine est un anti-métabolite qui bloque la formation et l'utilisation d'acides nucléiques essentiels pour la réplication de l'ADN. Les agents alkylants interfèrent avec l'appariement des bases de l'ADN, conduisant à la rupture des brins et les taxanes et les vinca-alcaloïdes interfèrent avec la fonction des microtubules requise pour la mitose cellulaire (Gerber, 2008). Cependant, en plus des cellules cancéreuses, la chimiothérapie affecte également les tissus normaux/sains ayant la capacité de se diviser rapidement, par exemple la MO, la bouche et l'épithélium gastro-intestinal. En conséquence, le traitement intensif provoque des effets toxiques graves chez la plupart des patients, dont la survenue d'infections, alopécie, ulcération buccale, gastrite et diarrhée, d'une cardiotoxicité et d'une myélosuppression (Faderl et Kantarjian, 2011). Les personnes âgées, chez qui le taux d'incidence de la leucémie est la plus élevée, présentent également une mortalité et morbidité liées du traitement élevées (Popat et Abraham, 2011).

Cependant, la résistance de cellules cancéreuses à la chimiothérapie est un problème majeur est la principale raison de l'échec des traitements traditionnels du cancer.

2. Place de la thérapie cellulaire dans les traitements

a) Avant allogreffe

Pour de nombreux patients atteints de tumeurs malignes hématologiques réfractaires, l'allogreffe de CSH reste la seule chance de guérison. Toutefois, en raison de sa toxicité élevée, celle-ci n'est envisagée que lorsque le patient a été mis en RC par les traitements conventionnels seuls ou associés à une chimiothérapie.

i. Place de l'autogreffe de CSH dans la prise en charge de la LAM

Bien que l'allogreffe de CSH soit la thérapie en post-rémission la plus fréquente dans les LAM à faible risque, la place de l'allogreffe de CSH dans le traitement des LAM à risque intermédiaire est débattue dans la littérature, la chimiothérapie ou l'autogreffe étant également considérées comme susceptibles de prolonger la survie à long terme, bien que le risque de rechute soit plus élevé que celui observé après allogreffe de CSH. Vellenga *et al* ont publié les résultats d'une étude de phase III comparant l'autogreffe de CSH *versus* une chimiothérapie de consolidation intensive chez des patients en RC1 (Vellenga *et al.*, 2011). Avec un suivi de plus de 5 ans, les taux de rechute après chimiothérapie *versus* après autogreffe de CSH étaient 70% *versus* 58%, respectivement ($p = 0,02$). L'étude a montré une différence non significative de la survie sans récurrence (RFS: *relapse-free survival*) de 29% *versus* 38% ($p = 0,065$). L'OS ne différait pas entre les 2 groupes et a été estimée respectivement à 41% *versus* 44%. Cette étude a montré un avantage de la prise en charge avec autogreffe en termes de survenue de la rechute mais la survie était similaire du fait que les patients en rechute dans le bras chimiothérapie seule aient bénéficiés d'une greffe ultérieure.

La comparaison autogreffe, chimiothérapie, allogreffe réalisée sur un effectif de 760 patients a montré une survie globale comparable entre les patients allogreffés et autogreffés atteints d'une LAM à risque intermédiaire. Cependant, les résultats montraient que les patients présentaient moins de rechute et une meilleure survie sans rechute après allogreffe soit après conditionnement myéloablatif classique (MAC: conventional myeloablative conditioning) ou un RIC (Figure 4). Des résultats similaires ont été observés pour de jeunes patients atteints de LAM en première RC (RC1) recevant soit une allogreffe de CSH d'un frère HLA identique ou une autogreffe utilisant des cellules souches périphériques (Keating *et al.*, 2013). Aucune différence significative dans l'OS n'a été observée mais les bénéficiaires d'allogreffe de CSH présentaient des pathologies à haut risque, et ont connu un plus faible taux d'échec du

traitement. Herr *et al* ont rapporté que l'allogreffe de CSH avec conditionnement atténué était similaire à l'autogreffe de cellules souches périphériques en termes d'OS et de RFS si elle a été utilisée en RC1 (Herr *et al.*, 2007). Un taux de rechute plus faible de 36% *versus* 50% a été contre balancé par une augmentation de la mortalité sans rechute (NRM: non-relapse mortality) chez les receveurs d'allogreffe de CSH. De plus, l'autogreffe de CSH peut être utilisée chez les patients jusqu'à l'âge de 70 ans (Herr *et al.*, 2007). Le schéma de conditionnement pour autogreffe de CSH était basé sur le busulfan chez 85% des patients. Bien que les deux busulfan oral et intraveineux ont été utilisés dans cette étude (Herr *et al.*, 2007), l'administration intraveineuse de busulfan provoque moins de complications (Ciurea et Andersson, 2009).

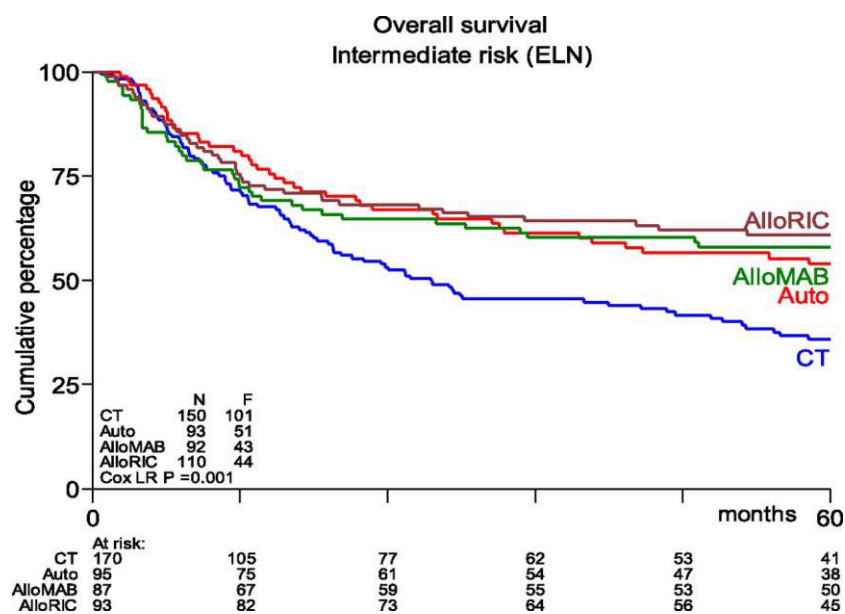


Figure 4. Les estimations de Kaplan-Meier de la survie globale des patients présentant une LAM à risque intermédiaire en RC1, entre 40 et 60 ans, selon le type de thérapie post remission (mise à jour les résultats de Cornelissen *et al* 2016) envisagé. Les receveurs de cellules souches hématopoïétiques (CSH) ont montré significativement une meilleure survie globale que les patients recevant un traitement chimiothérapeutique post remission ($p = 0,001$). (AlloMAB, myéloablatif allogreffe de CSH; AlloRIC, allogreffe de CSH de conditionnement d'intensité réduite; Auto, autogreffe de CSH; CT, chimiothérapie; ELN, European Leukemia Net. F, femelle; LR, régression logistique).

ii. Essais de traitements par thérapie cellulaire spécifique avant allogreffe: approches d'immunothérapie

1) Cellules Natural Killer (NK)

L'activité anti-tumorale de l'allogreffe de CSH est principalement liée à un effet immunologique du «greffon contre la tumeur (GVT: graft-versus-tumor)» médié par les cellules immunitaires présentes dans le greffon. Sur la base de cet effet, certaines équipes se sont intéressées à l'utiliser en dehors d'une allogreffe de CSH. Le premier essai basé sur cette approche a été publié par Miller *et al* en 2005. Ils ont décrit un transfert adoptif de cellules NK haploidentiques réalisés avec succès et l'expansion *in vivo* des cellules chez les patients recevant de l'interleukine 2 (IL-2) et atteints de mauvais pronostic LAM et non greffés (Miller *et al.*, 2005).

L'essai NKAML (étude pilote de la greffe de cellules NK haploidentique dans la LAM), a été menée à l'hôpital St. Jude Children dans le but de déterminer l'innocuité, la faisabilité et la greffe de cellules NK haploidentiques chez les enfants atteints LAM (Rubnitz *et al.*, 2010). Dix enfants (âgés de 0, 7 à 21 ans) en RC1 après quatre ou cinq cycles de chimiothérapie ont été inclus. Le schéma de préparation consistait en une chimiothérapie immunosuppressive, comprenant cyclophosphamide (60 mg/kg au jour -7) et fludarabine (25 mg/m²/j les jours -6 travers -2). Le schéma a été suivi par une perfusion de cellules NK et six doses d'IL-2 (1×10^6 U/m²) tous les deux jours à partir du jour -1. Il doit être noté que les cellules NK ont été perfusées immédiatement après l'enrichissement des cellules, sans aucune exposition à des cytokines *ex vivo*. La dose médiane des cellules NK était de 29×10^6 cellules/kg, tandis que la dose médiane de cellules T était de 1×10^3 /kg. Aucun patient n'a présenté de réaction du greffon contre l'hôte (GVHD: graft-versus-host disease). Une prise transitoire des cellules a

été documentée chez tous les patients jusqu'à une médiane de 10 jours (cellules NK persistant jusqu'à 6 mois après la perfusion ayant été observées chez un patient). Avec un temps de suivi médian de 964 jours, tous les patients inclus dans l'étude sont restés en rémission. Ces données suggèrent que la thérapie lympho-déplétante suivie par de l'administration de cellules NK partiellement HLA incompatibles est susceptible de réduire le risque de rechute chez enfants atteints de LAM.

Dans une autre étude, Curti *et al* ont étudié la faisabilité et la sécurité de la perfusion des cellules NK hautement purifiées issues de donneurs haploidentiques dans une cohorte de patients âgés atteints de LAM à haut risque. Treize patients atteints de LAM, ont reçu des cellules NK purifiées après une chimiothérapie immunosuppressive de type fludarabine/cyclophosphamide suivie par des injections d'IL-2. Le nombre médian de cellules NK infusées était de $2,74 \times 10^6$ /kg. Aucune toxicité liée aux cellules NK, y compris la GVHD, n'a été observée. Après la perfusion, les cellules NK du donneur ont été trouvées dans le sang périphérique des patients évaluables (valeur de crête au jour 10). Elles ont également été détectées dans la MO dans certains cas. La présence de cellules NK alloréactives a été montrée *in vivo*. Ces données suggèrent que la perfusion de cellules NK purifiées est possible et la thérapie à base de cellules NK présente un bénéfice clinique potentiel pour les patients ayant une LAM de mauvais pronostic (Curti *et al.*, 2011).

L'injection de cellules NK haploidentiques peut induire des rémissions chez certains patients atteints de LAM, mais l'immunosuppression induite par les Treg peut réduire leur efficacité. Bachanova *et al* ont traité 57 patients atteints de LAM réfractaire avec une chimiothérapie lymphodéplétante associant cyclophosphamide et fludarabine suivie par la perfusion de cellules NK et de l'administration d'IL-2. Dans cette étude, les patients ayant reçu de l'IL-2 combinée à une toxine diphthérique ont présenté le meilleur taux d'expansion

des cellules NK *in vivo*, une amélioration significative du taux de RC au jour 28 (53% *versus* 21%; $p = 0,02$) et de la survie sans maladie (DFS: disease-free survival) à 6 mois (33% *versus* 5%; $p < 0,01$). Dans la cohorte IL2DT, l'expansion des cellules NK était corrélée avec des taux sériques d'IL-15 plus élevés ($p = 0,002$). La fusion de l'IL-2 avec la toxine dyphtérique a permis de réduire les taux de lymphocytes T régulateurs qui entrent habituellement en compétition avec les cellules NK pour l'IL-2. Cela confirme la nécessité d'optimiser la cytokine administrée conjointement aux cellules NK afin d'éviter la concurrence avec d'autres lymphocytes pour améliorer l'efficacité clinique chez les patients atteints de LAM réfractaire (Bachanova *et al.*, 2014).

b) Lymphocytes T $\gamma\delta$

Dans le thymus, deux lignées fondamentalement distinctes de cellules T sont générées et sont définies de manière unique par leur expression d'un TCR $\alpha\beta$ ou un TCR $\gamma\delta$ (Nanno *et al.*, 2007). Contrairement aux cellules T $\alpha\beta$, qui se trouvent principalement dans les ganglions lymphatiques et le thymus, les lymphocytes T $\gamma\delta$ sont représentés de manière disproportionnée dans les épithéliums et les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses, où ils exercent des fonctions spécifiques à des sous-populations, tels que le maintien de l'intégrité de l'épiderme de la peau et de la régulation homéostatique de l'épithélium intestinal. Cependant, le nombre de cellules $\gamma\delta$ en circulation est faible en comparaison avec des cellules qui ont des récepteurs $\alpha\beta$ (Hayday et Tigelaar, 2003; Nanno *et al.*, 2007).

Le TCR $\gamma\delta$ consiste en deux glycoprotéines à liaison disulfure, une chaîne γ (45-60 kDa) et une sous-unité δ (40-60 kDa). TCR $\gamma\delta$ est exprimé sur moins de 10% des cellules T périphériques humaines (Kabelitz, 1992).

Cellules T $\gamma\delta$ sont capables de reconnaître leurs cibles d'une manière indépendante du

CMH par des récepteurs activateurs (entre autres, TCR $\gamma\delta$, NKG2D, TLRs, DNAM-1) (Bonneville *et al.*, 2010). Ces cellules présentent un phénotype préactivé qui permet de la production rapide de cytokines (IFN γ , TNF- α) et une réponse cytotoxique forte lors de l'activation (Figure 5). Les fonctions des cellules T $\gamma\delta$ sont hétérogènes, allant de la protection contre les agents pathogènes intra- et extracellulaires à la surveillance de la tumeur, la modulation de la réponse immunitaire et l'entretien des tissus (Jameson et Havran, 2007; Hayday, 2009).

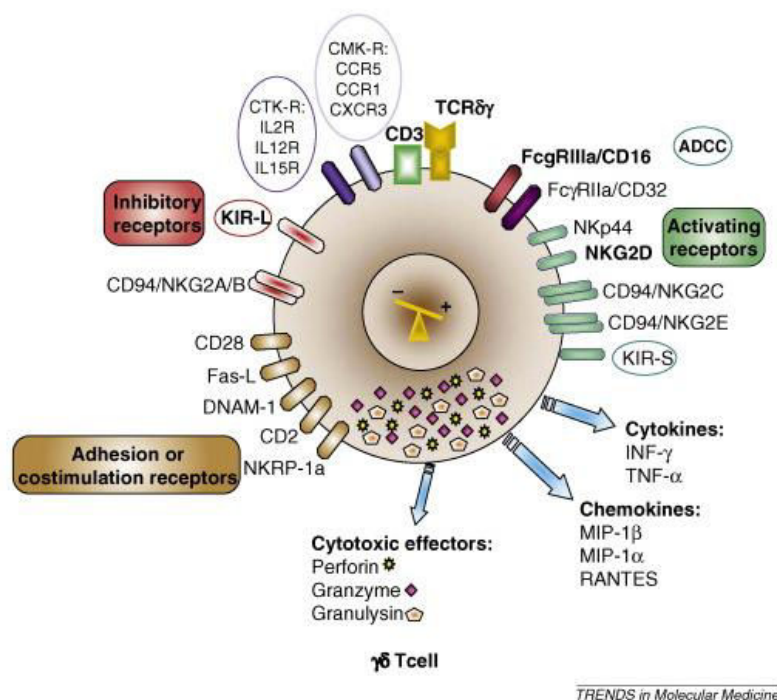


Figure 5. Récepteurs des cellules T $\gamma\delta$. Les récepteurs ont été classés comme récepteurs activateurs (vert), qui médient la cytolyse, l'adhérence ou les récepteurs de co-stimulation (brun), qui contribuent à des signaux positifs et les récepteurs inhibiteurs (rouge), qui inhibent la cytolyse. Les cellules T $\gamma\delta$ et NK expriment certains récepteurs communs, tels que le NKG2D et KIR. L'intégration de ces signaux contribue à la régulation des activités des cellules NK ou des cellules T $\gamma\delta$, qui comprennent l'activation, la prolifération, la sécrétion de cytokine ou chimiokine. La cytolyse est en partie déclenchée par la libération de granules contenant de la perforine cytotoxiques ou granzymes (Rey *et al.*, 2009).

Les principaux avantages de l'immunothérapie avec des lymphocytes innés par rapport aux cellules T $\alpha\beta$ de CMH-restreint sont qu'ils peuvent tuer les cellules tumorales sans exposition préalable et sans provoquer de GVHD (Lowdell *et al.*, 2001).

Wilhelm *et al* ont présenté pour les premières données montrant que le transfert adoptif de cellules T $\gamma\delta$ haploidentiques était un moyen pratique et sûr pour l'expansion *in vivo* de ces cellules immunitaires innées effectrices chez les patients atteints de tumeurs malignes hématologiques réfractaires (Wilhelm *et al.*, 2014). Dans cette étude pilote, quatre patients atteints de tumeurs malignes hématologiques réfractaires avancées (un lymphome T non Hodgkinien (T-LNH), une LAM, une leucémie secondaire à plasmocytes, et un myélome multiple (MM)) qui n'étaient pas admissibles à une greffe allogénique ont été inclus. Une leucaphérèse non stimulée a été incubée avec des anticorps anti-CD4 et anti-CD8 conjugués à des particules paramagnétiques. En moyenne, les patients ont reçu $2,17 \times 10^6$ /kg cellules T $\gamma\delta$ avec $< 1\%$ cellules CD4- ou CD8-positives restantes dans le produit. Tous les patients ont reçu une chimiothérapie afin d'induire une lymphodépletion (fludarabine 20-25 mg/m², jour -6 jusqu'au jour-2 et du cyclophosphamide 30-60 mg/kg au jour -6 et -5), et ont été traités avec 4 mg de zolédronate au jour 0 et $1,0 \times 10^6$ UI/m² de l'IL-2 de J1 à J6 pour l'induction de la prolifération des cellules T $\gamma\delta$ *in vivo*. Il en résulte une expansion marquée *in vivo* des cellules T $\gamma\delta$ du donneur et, dans une moindre mesure, les cellules NK et les cellules T $\alpha\beta$. La prolifération a atteint un pic à J8 et les cellules du donneur ont persisté jusqu'à 28 jours. Aucun signe de GVHD aiguë (GVHDa) ou chronique (GVHDc) n'a été observé. Bien que réfractaire à tous les traitements antérieurs, trois des quatre patients ont été mis en RC.

b) L'allogreffe de CSH

L'allogreffe de CSH est une thérapie potentiellement curative pour les patients atteints de leucémie aiguë combinant une chimiothérapie et/ou radiothérapie intensive appelée conditionnement, à une greffe de CSH prélevée chez un donneur compatible. Dans la LAM et LAL, l'allogreffe est souvent recommandée en RC1 chez les patients présentant un pronostic défavorable lorsque le risque de rechute est élevé. Un autre scénario fréquent est l'allogreffe en deuxième rémission après une rechute du fait que ces patients sont rarement guéris par la chimiothérapie conventionnelle. Les progrès de l'allogreffe de CSH avec le développement de conditionnements à toxicité atténuée permettent d'élargir les indications de ce type de traitement à des patients plus âgés. Ces progrès comprennent (i) une meilleure identification des personnes susceptibles de bénéficier d'une transplantation antérieure tels que les patients atteints de LAM avec un caryotype normal avec des marqueurs moléculaires indésirables; (ii) une meilleure sélection des donneurs non apparentés avec l'utilisation de typage HLA haute résolution au niveau allélique; (iii) l'utilisation du sang de cordon ombilical (UCB) comme source de cellules souches; (iv) le RIC; et (v) les progrès dans les soins de soutien. Le RIC est potentiellement attractif pour les patients plus âgés chez lesquels les résultats de l'allogreffe de CSH auraient été médiocres en raison de la forte mortalité liée au traitement (Horwitz, 2011).

Dans la LAL, l'allogreffe de CSH bénéficie clairement à plusieurs sous-groupes de patients, tels que la LAL Ph⁺ (même lorsqu'ils sont traités avec un TKI), ceux qui ont une mauvaise réponse initiale au traitement, et les adultes avec des réarrangements du gène MLL (par exemple t(4; 11)). Cependant, la sélection des patients et le calendrier de l'allogreffe de CSH dans ALL restent controversés. Une grande étude multicentrique publiée a conclu que même les patients à risque-standard en RC1 bénéficient davantage de l'allogreffe de CSH que de la chimiothérapie (Goldstone *et al.*, 2008). Cette conclusion contraste avec celle des études

publiées antérieurement dans lesquelles l'allogreffe de CSH n'a pas favorisé les patients à risque-standard. Ces résultats apparemment contradictoires peuvent être expliqués par des améliorations en matière de transplantation, ainsi que la variabilité de la définition du risque standard et élevé entre ces études.

c) Après greffe

i. Méthode de détection de la rechute

La rechute après allogreffe de CSH est fréquente avec des taux avoisinant les 40% chez les malades à haut risque et présage généralement un très mauvais pronostic (Miller *et al.*, 2010). Traditionnellement, la détection de l'imminence d'une rechute dans la période post-transplantation avait été basée sur l'analyse du chimérisme du donneur, mais le manque de spécificité reste un problème. Par conséquent, l'intérêt porté sur la détection de la maladie résiduelle minimale (MRD: minimal residual disease) dans les soins de patients post-transplantation permet de détecter une réapparition des cellules leucémiques le plus tôt possible (Bacher *et al.*, 2012).

1) Chimérisme

Le chimérisme après greffe de CSH renseigne sur la qualité de la prise de greffe et permet d'anticiper un traitement adapté pour le patient. La surveillance post-greffe permet de prédire des événements, comme la rechute, la GVHD ou le rejet, et de mettre en oeuvre rapidement un traitement ou une immunothérapie adaptée, telle que l'injection des lymphocytes du donneur (DLI) (Bader *et al.*, 2005; Baron et Sandmaier, 2006).

L'étude du chimérisme après greffe de CSH est réalisée en analysant simultanément des systèmes génétiques propres au donneur et au receveur. Une étude séquentielle de ces

systemes chez le patient greffé permet de mettre en évidence la présence de cellules donneur et/ou receveur, de les quantifier et d'évaluer leur évolution. On parle de chimérisme total (CT) lorsque seules les cellules du donneur sont détectées et de chimérisme mixte ou partiel (CM) lorsque des cellules du donneur et du receveur sont présentes simultanément. La quantification de ce CM a été proposée comme une méthode pour suivre l'évolution post-greffe (Baron *et al.*, 2004). Un CM après greffe de CSH peut signaler la réapparition de cellules tumorales, car la présence de cellules provenant du receveur précède souvent une rechute hématologique qui peut évoluer rapidement. L'apparition, ces dernières années, de greffes à conditionnement atténué (non myélo-ablatif) ou de RIC a permis de réduire la toxicité de la greffe et de la réaliser chez des sujets âgés ne pouvant supporter un conditionnement standard. En revanche, ces greffes de type RIC laissent apparaître plus fréquemment un état de CM et augmentent l'importance du suivi du chimérisme post-greffe (Jacquet *et al.*, 2003; Mothy *et al.*, 2007). Il est également possible d'affiner l'analyse du chimérisme en ciblant certaines populations afin d'obtenir une détection précoce des fractions cellulaires du receveur (Zeiser *et al.*, 2005; Liesveld et Rothberg, 2008).

2) Maladie résiduelle

Des taux faibles de cellules leucémiques, appelées MRD, ont été associés à un risque accru de rechute et à un raccourcissement de la survie (San Miguel *et al.*, 1997). Le rôle, les méthodes et la source tissulaire optimale pour la détermination MRD avant et après allogreffe de CSH sont pas encore entièrement déterminés (Bacher *et al.*, 2011). Le sang périphérique et la MO ont été utilisés chez les patients pour déterminer la persistance de faibles niveaux de maladie, avec environ 75% des échantillons donnant des résultats concordants. Le sang périphérique dans certains cas, peut être moins sensible que les échantillons de moelle dans la

détection de faibles niveaux de la maladie. Cependant, son accès facile permet une surveillance continue (Stahl *et al.*, 2010). La MRD détecte plus précocement la récurrence de la maladie, ce qui permet d'intervenir plus rapidement par la levée rapide de l'immunosuppression ou l'administration de d'immunothérapies (Bader *et al.*, 2008; Diez-Campelo *et al.*, 2009).

ii. Approches d'immunothérapies

1) Injections de lymphocytes du donneur (DLI)

La DLI est une approche de l'immunothérapie adoptive la plus fréquemment utilisée pour traiter les patients en rechute de maladie hématologique maligne après allogreffe de CSH. L'effet de la DLI est médiée par l'activité anti-tumorale des cellules T du donneur et éventuellement des cellules NK (Bar *et al.*, 2013). L'efficacité de cette approche dépend du type de maladie et de la dose de lymphocytes CD3⁺ infusée. Des résultats encourageants ont été observés dans la leucémie myéloïde chronique (LMC) et les lymphomes indolents; cependant, la réponse est généralement limitée dans la rechute de LAM ou LAL, et les patients sont à risque de GVHD grave ou d'aplasie médullaire (Huang *et al.*, 2007). La dose de cellules utilisées dans les différentes études variait de 0,01 à $8,8 \times 10^8$ cellules T/kg. Certains chercheurs ont suggéré qu'une dose de cellules de moins de 1×10^8 lymphocytes T/kg n'est pas optimale. Une dose de cellules au-dessus de $4,5 \times 10^8$ cellules T/kg ne semble pas offrir de meilleurs taux de réponse et peut éventuellement entraîner des complications et être préjudiciable (Bar *et al.*, 2013).

La DLI thérapeutique (tDLI) est administrée aux patients chez lesquels le résultat souhaité de la greffe n'a pas été atteint, dans le traitement de la rechute, et plus récemment, pour corriger un chimérisme du donneur incomplet après un conditionnement non-

myéloablatif ou RIC. Plusieurs rapports ont été publiés sur l'utilisation de DLI en tant que traitement après greffe de CSH (Tableau 2) (Michallet *et al.*, 2005; Huff *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2007). Ces études ont montré que la DLI est une option thérapeutique potentiellement efficace pour les patients atteints d'une hémopathie maligne en rechute après greffe de CSH. En raison de l'augmentation des taux de rechute après la déplétion en lymphocytes T de l'allogreffe de CSH, plusieurs études ont examiné l'utilité de DLI prophylactique (pDLI) pour minimiser la récurrence tumorale (Tableau 2) (Montero *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2012; Liga *et al.*, 2013). Liga *et al.* ont montré que les patients atteints de leucémies qui reçoivent de faibles doses de pDLI après conditionnement par alemtuzumab sont à faible risque de récurrence; toutefois, cette approche est associée à une incidence relativement élevée de GVHD grave (Liga *et al.*, 2013). Wang *et al.* ont montré que le taux de récurrence plus faible et une probabilité de survie plus élevée ont été obtenus avec des patients qui ont reçu pDLI par rapport aux patients qui n'ont pas. Les résultats ont suggéré que la prophylaxie de rechute avec l'utilisation de pDLI peut augmenter la survie des patients atteints d'un stade avancé de leucémie aiguë (Wang *et al.*, 2012). Montero *et al.* ont souligné l'importance de la GVHDc pour soutenir un effet de GVL après allogreffe de CSH et ont montré qu'il est possible de concevoir des protocoles qui minimisent la morbidité et la mortalité de GVHD (Montero *et al.*, 2006). Une façon de surmonter ces problèmes est liée à la possibilité de sélectionner des sous-populations de leucocytes avec un effet GVL efficace et un risque de GVHD réduit ou absent (Deol et Lum, 2010).

Tableau 2. Rapports publiés sur l'utilisation de DLI comme prophylaxie ou traitement après greffe de CSH.

Référence/ suivi après	No.	Maladies	Source de donneurs (N)	Dose cellulaire ($\times 10^6$) les cellules sont des cellules T CD3 ⁺ , sauf mention (N)	GVHDa grade II-IV	GVHDc	Réponse/ rechute	OS	PFS/LFS	TRM
Huang et al, 2007 1118 jours	12	LAM ; LAL ; LMC	MRD	7-439/kg	6/12	7/12	tDLI 8/12	NR	1an: 60% 2ans: 40%	NR
Huff et al, 2006 LMC: 857 jours Autres: 383 jours	83	LMC; MM; LAM; MDS; LAL; LH; LNH	MRD	LMC: 10/kg MM, MDS:50/kg LAM/LAL, LH, LNH:100/kg escalade de dose	29/83	27/83	tDLI ORR:37/83	LMC PC à 2 ans: 16/17 Autres à 1 an: 9/66	NR	22/83
Micheallet et al, 2005 58 mois	30	LMC; MM; LAM; MDS; LAL; LNH	MRD URD	BDR: 10- 264/kg (n=10) ESD: 1-300/kg (n=20)	4/30	3/30	tDLI ORR:18/30	à 3 ans LMC: 80% Autre: 48%	NR	NR
Liga et al, 2013 575 jours	15	LAM ; LAL	PBSC apparenté/ nonapparenté	dose médiane: 2/kg	3/15 (20%)	3/15 (20%)	pDLI, pas de rechute	87±9%	72±12%	27%
Wang et al, 2012 248 jours	61	LAM; LAL	PBSC de HLA- nonapparenté	dose médiane: 57/kg	41.9 ± 30.5%	45.4 ± 7.0%	pDLI 35.7±7.7%	30.5%	22%	38%
Montero et al, 2006 47 mois	138	LAM; LAL; LMC;	TCD de MO apparenté	10/kg	53/138 (38%)	71/116 (61%)	pDLI 20±5%	58±5 %	46±5%	20±4%

BDR, bulk dosing regimen; CSH, cellules souches hématopoïétiques; DLI, injection de lymphocytes du donneur; ESD, escalated dosing regimen; GVHDa, greffon contre l'hôte aiguë; GVHDc, greffon contre l'hôte chronique; LAL, leucémie aiguë lymphoblastique; LFS, leukemia-free survival; LH, lymphome de Hodgkin; HLA, humain leucocyte antigen; LAM, leucémie aiguë myéloïde; LNH, lymphome non Hodgkinien; MDS, myélodysplasie; MM, myélome multiple; MO, moelle osseuse; MRD, donneur apparenté appariés; No., nombre de patients; NR, pas signalé; ORR, objective response rate; OS, overall survival; PBSC, peripheral blood stem cell; PC, phase chronique; PFS, progression-free survival; TCD, déplétion des cellules T; TRM, mortalité liée au traitement; URD, donneur non apparenté.

2) Lymphocytes T cytotoxiques (CTL: cytotoxic T lymphocyte)

Le manque de spécificité de l'effet GVL est à l'origine de la GVHD. Par conséquent, des efforts considérables ont été faits pour identifier les antigènes cibles capables d'induire une réponse plus spécifique dirigée contre les cellules tumorales. Ces antigènes se répartissent en deux catégories: les antigènes mineurs d'histocompatibilité (mHAgs) exprimés par les progéniteurs leucémiques et les antigènes associés aux tumeurs (TAA) représentant diverses protéines surexprimées par la leucémie (Barret, 2008).

i. CTLs spécifiques de mHAgs

Une sous-population d'antigènes mineurs d'histocompatibilité est exprimée sur des cellules hématopoïétiques du receveur, y compris les cellules souches leucémiques, mais pas sur les tissus cibles de la GVHD (Warren *et al.*, 2010). Marijt *et al* ont traité sur 3 patients mHAgs HA-1-et/ou HA-2-positives en rechute de leur maladie après allogreffe de CSH avec des DLI prélevées chez leurs donneurs mHAgs HA-1-et/ou HA-2-négatifs. L'émergence de cellules T CD8⁺ spécifiques de HA-1- et 2 dans les 5-7 semaines après la DLI a été associée à une RC durable (Marijt *et al.*, 2003). Ces travaux préalables ont permis par la suite de

developper la technique d'expansion de lignées de CTL spécifiques *ex vivo*. Une réponse anti-leucémique a été observée chez 4 des 8 patients traités (Marijt *et al.*, 2007). Des résultats similaires ont été obtenus par Warren *et al* avec cependant une toxicité plus importante détectée au niveau pulmonaire (Warren *et al.*, 2010).

ii. CTLs spécifiques de TAA

Un certain nombre de TAA sont connus pour être exprimés largement par les leucémies myéloïdes: gène 1 de la tumeur de Wilms (WT1), la protéinase 3, l'élastase neutrophile humaine, l'antigène A3 associé au mélanome et l'antigène exprimé préférentiellement du mélanome. La protéine WT1 a été la plus largement caractérisée. WT1 est surexprimé dans diverses tumeurs malignes hématologiques jusqu'à 70% des patients atteints de LAM, LAL, LMC, et le syndrome myélodysplasique (MDS: myelodysplastic syndrome) (Tyler *et al.*, 2013). Un haut niveau d'expression de WT1 par des blastes leucémiques dans LAM est associé à une mauvaise réponse à la chimiothérapie, un plus grand risque de rechute, et une probabilité de survie prolongée sans maladie plus réduite. Pour ces raisons, l'expression de WT1 sert de marqueur pronostique, et est utilisée pour surveiller la réponse de la maladie et la MRD (Tyler *et al.*, 2013). Les lymphocytes T CD8⁺ spécifiques de WT1 peuvent distinguer des cibles sur-exprimant cet antigène par rapport aux cellules normales et il a été démontré qu'ils sont capables de lyser des cellules leucémiques mais pas les cellules CD34⁺ normales (Chapuis *et al.*, 2013). Les réponses des cellules T CD8⁺ contre WT1 survenus chez des patients après greffe de CSH ont été associé à une réduction du nombre de cellules malignes et du risque de rechute (Tyler *et al.*, 2013), et la fréquence médiane de WT1-CTL (1,38%) chez les patients présentant une rémission moléculaire (MoR) était significativement plus élevée que chez ceux qui n'ont pas de MoR (0,38%) à 30 jours après allogreffe de CSH

(Wang *et al.*, 2010).

Dans une étude récente, Chapuis *et al* ont montré que l'IL-21 utilisée pour limiter la différenciation terminale des CTL *ex vivo* était susceptibles de prolonger la survie de clones de CTL CD8⁺ spécifiques de WT1 *in vivo et* maintenait les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles associées à des lymphocytes T CD8⁺ mémoire à long terme (Chapuis *et al.*, 2013).

Les résultats de ces études ont illustré la possibilité d'améliorer de manière sélective l'activité de GVL par le transfert adoptif de CTL spécifiques de l'antigène après allogreffe de CSH. Les stratégies pour activer et/ou étendre les CTL pour transfert adoptif sont résumés dans le Tableau 3.

Tableau 3. Méthodes pour isoler, activer et étendre des cellules pour les immunothérapies adoptives après greffe de CSH.

Cellules	Références	population de départ	méthode	Conditions de culture	Temps de culture
CTLs de mHAg	Marijt et al, 2003	PBMCs de donneur	Stimulation directe de PBMC avec le peptide, sélection de tétramère	Milieu de Dulbecco modifié par Iscove; sérum humain 10%; cellules nourricières allogéniques, phytohémagglutinine, IL-2	< 1 jour
CTLs de mHAg	Marijt et al, 2007	PBMCs de donneur	Stimulation directe de PBMC avec le peptide	IMDM additionné de plasma 10% héparine de donneur, cellules présentatrices d'antigènes leucémiques irradiés, IL-2	3-4 semaines
CTLs de mHAg	Warren et al, 2010	PBMC après la transplantation du receveur	Stimulation de PBMCs avec PBMCs irradiés de receveur	Milieu RPMI 1640, L-glutamine, tampon HEPES, pénicilline 1%/	10-12 semaines

			prétransplantation et EBV-LCL irradié dérivé de receveur	streptomycine, 2- mercaptoéthanol, sérum AB humain 10% inactivé par la chaleur, IL-2	
CTLs de TAA	Chapuis et al, 2013	PBMCs de donneur	Cellules T CD8 ⁺ sélectionné par des billes ont été stimulées avec DC autologues et peptide	-	7-10 jours
CIK	Introna et al, 2007	échantillons de leucaphérèse des donneurs	Culture avec rhIFN γ , anticorps OKT3, rhIL-2	Milieu sans sérum X- VIVO, glutamine, gentamicine	20-26 jours
CIK	Introna et al, 2010	Cellules mononuclées d'UCB sac affouillements	Culture avec rhIFN γ , anticorps OKT3, rhIL-2	Milieu sans sérum X- VIVO 15, glutamine, gentamicine	21-28 jours
CIK	Laport et al, 2011	échantillons de leucaphérèse des donneurs	Culture avec rhIFN γ , anticorps OKT3, rhIL-2	Milieu Aim-V, plasma autologue (donneur) inactivé par la chaleur	21-28 jours
CIK	Linn et al, 2012	PBMCs de donneur	Culture avec rhIFN γ , anticorps OKT3, rhIL-2	RPMI, sérum de veau foetal 10%	28 \pm 1 jours
CIK	Zhong et al, 2012	PBMCs de receveur	Culture avec rhIFN γ , anticorps OKT3, rhIL-2	Milieu sans sérum X- VIVO, glutamine, gentamicine	11-12 jours
NK	Koehl et al, 2004 Brehm et al, 2011 Stern et al, 2013	cytaphérèses non stimulées	Deux étapes de déplétion de CD3 ⁺ par des microbilles CD3 qui s'ensuit avec la sélection de CD56 par des microbilles CD56	Milieu X-VIVO 10, AB 10% inactivé plasma frais congelé, rhIL-2	10-14 jours
NK	Yoon et al, 2010	cellules progénitrices CD34 ⁺ de donneur	Culture avec facteur de cellule souches humaines, tyrosine kinase 3 ligand liées fms humains, IL-7 humains	milieu complet de Myelocult, IL-15 humaine, IL-21 humaine, hydrocortisone	42 jours
NK	Rizzieri et al, 2010	cytaphérèses non stimulées	Utilisation d'un anticorps CD56	-	Frais

AB, albumine; DC, cellules dendritiques; CIK, cytokine induced killer; CSH, cellules souches hématopoïétiques; CTL, lymphocytes T cytotoxiques; mHAg, antigènes mineurs d'histocompatibilité; NK, natural killer; PBMC, cellules mononuclées du sang périphérique; rhIFN γ , interféron- γ humain recombinant; rhIL-2, interleukine-2 humaine recombinante; TAA, antigènes associés à tumeur; UCB, sang de cordon ombilical.

3) Cellules T $\gamma\delta$

Un certain nombre d'études *ex vivo* et *in vivo* suggèrent que les cellules T $\gamma\delta$ peuvent être utiles dans le cadre de la greffe de CSH (Rey *et al.*, 2009; Locatelli *et al.*, 2013). Les cellules T $\gamma\delta$ peuvent médier une activité antitumorale innée et pourraient être capables de faciliter la prise de greffe allogénique. En outre, il semble que les cellules T $\gamma\delta$ ne provoquent pas de GVHD. Cependant, peu d'études portent spécifiquement sur le rôle des cellules T $\gamma\delta$ dans le cadre de la greffe de CSH.

L'action protectrice des cellules T $\gamma\delta$ contre la rechute de la maladie chez les patients après greffe de MO a été rapportée par Lamb *et al.* (Lamb *et al.*, 1996). Plusieurs patients qui ont reçu une greffe de MO déplétée en cellules T $\alpha\beta$ ont développé ultérieurement une augmentation spontanée des taux de cellules T $\gamma\delta$ au cours de la première année après greffe de CSH. Ces patients ont présenté une amélioration significative de la survie sans maladie par rapport aux patients à risque similaire. Il est intéressant de noter que l'augmentation des cellules T $\gamma\delta$ a persisté chez les patients survivants jusqu'à plusieurs années après la transplantation.

Des observations similaires ont été notées par Godder *et al.*, qui ont recueilli les taux de cellules T $\gamma\delta$ façon prospective chez 153 patients (77 LAL; 76 LAM) subissant une allogreffe de CSH partiellement incompatible. Tous les patients ont reçu une greffe partiellement déplétée en cellules T en utilisant T10B9 (n = 46) ou OKT3 (n = 107). La survie sans leucémie et l'OS des patients avec des cellules T $\gamma\delta$ augmentées par rapport à ceux avec des

valeurs normales/diminuées étaient de 54,4% *versus* 19,1% et 70,8% *versus* 19,6%, respectivement. Dans une analyse multivariée de Cox, les patients avec des cellules T $\gamma\delta$ normales/diminuées ont présenté une moins bonne survie sans leucémie (Godder *et al.*, 2007).

Si différentes études suggèrent que le transfert adoptif de cellules T $\gamma\delta$ chez les patients atteints de tumeurs malignes hématologiques réfractaires avancées qui n'étaient pas admissibles à une greffe allogénique est possible (Wilhelm *et al.*, 2003; Abea *et al.*, 2009), elles peuvent également être envisagées dans le traitement d'une variété de tumeurs malignes dans le cadre de l'allogreffe de CSH.

4) Cytokine induced killer (CIK)

La présence de lymphocytes cytotoxiques infiltrant les tumeurs (TIL: tumor infiltrating lymphocytes) est associée à une augmentation de la survie des patients cancéreux (Fox *et al.*, 2011; Fridman *et al.*, 2011). L'immunité anti-tumorale adaptative et l'immunité cellulaire innée sont importantes pour limiter la croissance tumorale et l'élimination éventuelle du cancer. Théoriquement, les réponses immunitaires cellulaires anti-tumorales peuvent être grandement améliorées par le transfert adoptif de lymphocytes, un terme qui englobe une stratégie dans laquelle des cellules T ou NK autologues sont acquises à partir d'un patient atteint de cancer puis activées et développées *ex vivo* avant réinjection. La thérapie cellulaire adoptive du cancer, a été démontrée pour la première fois chez des souris il y a plus de 60 ans (Mitchison, 1955), a pris de l'ampleur au cours des dernières années en raison des expériences cliniques avec patients atteints de mélanome (Rosenberg *et al.*, 2011). Cette approche est basée sur l'expansion *ex vivo* d'un grand nombre de TIL et de sélection de lignées de cellules T spécifiques de tumeur. Les TIL sont des cellules T $CD3^+CD8^+$ et leurs fonctions anti-tumorales sont restreintes par le CMH (Rosenberg *et al.*, 1986). Beaucoup de patients atteints

de cancer ne sont pas éligibles pour la thérapie à base de TIL parce que leurs TILs ne s'expandent pas suffisamment ou parce que leurs tumeurs ont perdu l'expression des antigènes ou des molécules du CMH ou ont un très faible nombre de TILs. CIK sont une population hétérogène de cellules T CD8 effectrices avec diverses spécificités de TCR, possédant des activités cytolytiques non restreintes par le CMH contre les cellules tumorales. Par conséquent, les cellules CIK peuvent lyser les cellules tumorales d'une manière non restreinte par le CMH et peuvent servir d'immunothérapie cellulaire alternative (Jiang *et al.*, 2013).

i. Généralités

Les cellules CIK sont générées par l'expansion *ex vivo* de lymphocytes du sang périphérique en utilisant des anticorps anti-CD3 et de l'IL-2. La culture à court terme de lymphocytes du sang périphérique humain avec de l'IL-2 permet la prolifération et le développement des cellules NK effectrices et des lymphocytes T non spécifiques, avec l'activité de lymphokine-activated killer (LAK) (Yron *et al.*, 1980; Lotze *et al.*, 1980). L'activité de LAK permet la lyse des cibles tumorales fraîches d'une manière non HLA restreinte *ex vivo* et exerce également des effets anti-tumoraux *in vivo*. Néanmoins, l'utilisation des cellules LAK comme une immunothérapie anti-tumorale n'a pas obtenu beaucoup de succès clinique et est entravée à la fois par l'expansion limitée des cellules LAK *ex vivo* et par une faible activité cytolytique *in vivo* (Mule *et al.*, 1984). L'extrapolation en clinique humaine à partir de modèles murins d'immunothérapie suggère que près de 2×10^{11} cellules LAK humaines peuvent être nécessaires pour permettre des réponses anti-tumorales adéquates (Ochoa *et al.*, 1987). En outre, la thérapie à base de LAK a été limitée par la toxicité élevée liée à l'administration d'IL-2. Une solution à ce problème consiste à augmenter la cytotoxicité des lymphocytes T expansus. A cet effet, des anticorps

monoclonaux (mAbs) agonistes contre le CD3 et IL-2 ont été ajoutés à la culture de cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC: peripheral blood mononuclear cell). En 21 jours, les cellules peuvent être expansées plus de 1000 fois *ex vivo* (Ochoa *et al.*, 1987). L'activité lytique de ces cellules peut encore être augmentée en ajoutant d'autres cytokines telles que l'IFN- γ et l'IL-1 β (Ochoa *et al.*, 1987). Les conditions de culture initiales définissant l'activité des CIK ayant été modifiées par l'ajout d'IFN- γ 24 h avant l'addition de l'anticorps anti-CD3 et de l'IL-2 (Figure 6), le terme de CIK a alors été utilisé pour les distinguer des LAK conventionnels activés par l'IL-2 (Schmidt-Wolf *et al.*, 1991). Elles présentent une multiplication par plus de 70 de leur cytotoxicité et une réponse proliférative supérieure, par rapport aux LAK stimulées par l'IL-2 (Schmidt-Wolf *et al.*, 1991).

Parmi les cellules CIK expansées, les cellules avec la plus grande cytotoxicité contre des lignées de cellules tumorales expriment à la fois le marqueur des cellules T CD3 et le marqueur de NK CD56. Les cellules CD3⁺CD56⁺ sont rares dans les lymphocytes du sang périphérique (Schmidt-Wolf *et al.*, 1993). Lorsque les lymphocytes du sang périphérique sont cultivés dans des conditions similaires à des CIK pendant 21 jours, plus de 90% des cellules expansées sont CD3⁺ (Leemhuis *et al.*, 2005). Ils sont constitués d'environ 70% de cellules CD8⁺ et 30% de cellules CD4⁺. Le pourcentage de cellules CD3⁺CD56⁺ augmente également considérablement et représente plus de 20 à 30% des cellules CIK, compatibles avec la génération de cellules T effectrices dans ces cultures après environ 21 jours de culture. La plupart des cellules CD3⁺CD56⁺ co-expriment le CD2, le TCR $\alpha\beta$ et le CD8 mais sont négatifs pour le CD4, le marqueur de cellule Th et le CD16, un marqueur de cellule NK. La cytotoxicité médiée par les cellules CD3⁺CD56⁺ ne dépend pas du CMH, similaire à celle médiée par les cellules NK. Fait intéressant, l'activité anti-tumorale est limitée à la CIK CD3⁺CD56⁺ et l'alloréactivité contre cellules mononucléées HLA-mésappariées est limitée à

la CIK CD3⁺CD56⁻ (Sangiolo *et al.*, 2008). Ces cellules se distinguent des cellules NK, car elles ne médient pas la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC: antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity). Cellules CD3⁺CD56⁺ expansées dans ces conditions de culture sont dérivées de cellules T CD3⁺CD56⁻, et non à partir de cellules NK CD3⁻CD56⁺ (Lu et Negrin, 1994). Après la culture, les cellules T CD3⁺CD8⁺, mais pas les CD3⁺CD4⁺ expriment des niveaux élevés de CD56. Ceci est cohérent avec le fait que les cellules T CD8 effectrices possèdent des niveaux élevés d'activité cytotoxique (Lu et Negrin, 1994). En outre, cellules CIK sont CD45RA⁺, CCR7, CD62L positif faiblement, CD11a⁺, CD27⁺, CD28⁺, protéine inflammatoire macrophage 1a⁺, perforine⁺, ligand Fas⁺, suggérant que ce sont des cellules T mémoire largement différenciées (Lu et Negrin, 1994). De plus, le répertoire V β dans des cellules CIK à la fin de la culture est de motif polyclonal. Ainsi, les conditions de culture CIK génèrent une population hétérogène de cellules T CD8 effectrices avec divers spécificité TCR mais possèdent une activité cytolytique contre des cellules tumorales non-CMH-restreinte.

En raison de la cytotoxicité non-HLA-restreinte très forte de cellules CIK et surtout, sur la base des observations précliniques que les cellules CIK n'induisent pas de GVHD dans un contexte allogénique, les chercheurs ont suggéré que les cellules CIK dérivées de donneurs puissent être administrées aux patients leucémiques en rechute après allogreffe de CSH (Linn *et al.*, 2012).

ii. CIK (cytokine induced killer) et post-allogreffe de CSH

Le premier essai clinique de phase I sur l'utilisation de CIK dans un contexte allogénique dans le cadre de traitement des hémopathies malignes a été réalisé par Introna *et al* en 2007 (Introna *et al.*, 2007). Dans cette étude, 11 patients atteints de LAM (n = 4), de lymphome de

Hodgkin (LH, n = 3), de leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC, n = 1), LAL pré-B (n = 1) et MDS (n = 2) en rechute après greffe de CSH de la fratrie (n = 6) ou d'un donneur non apparenté (MUD: matched unrelated donor) (n = 5) ont reçu au moins une perfusion de cellules CIK. Les infusions ont été bien tolérées et aucune réaction aiguë ou tardive liée à la perfusion n'a été signalée. Des GVHDA grade I et II ont été observées chez 4 patients, 30 jours après la dernière perfusion de cellules CIK. La progression de la maladie et la mort a été observée chez 6 patients, 1 patient avait une maladie stable, 1 avait une amélioration hématologique et 3 ont présenté une RC. Dans une autre étude, la même équipe a démontré que l'expansion de CIK à partir de fonds de poches de greffons de sangs de cordon était faisable. Aucun événement indésirable aigu ou retardé n'a été observé et une réponse partielle (RP) a été obtenue chez un patient mais accompagnée de façon concomitante du développement de GVHDA de grade III. Ces observations ont montré la toxicité relativement faible de cellules CIK dérivées de sang de cordon et la faisabilité de ce programme d'immunothérapie pour les patients qui ne pourraient pas autrement bénéficier de DLI (Introna *et al.*, 2010).

Dans un autre essai clinique de phase I pour évaluer la faisabilité et la sécurité des cellules CIK allogéniques, 18 patients qui avaient rechuté après allogreffe de CSH apparentée ont reçu des perfusions de doses croissantes de CIK. Une GVHDA de grade I-II a été observée chez 2 patients, et 1 patient avait une GVHDC limitée. Après un suivi médian de 20 mois (extrêmes: 1-69 mois), l'OS médiane était de 28 mois et la médiane de survie sans événement était de 4 mois (Laport *et al.*, 2011).

Dans une expérience plus récente publiée par Linn *et al.*, une réponse prolongée à plus de 2 ans a pu être observée pour certains des patients traités mais l'injection de CIK s'est accompagnée de la survenue de GVHDA (Linn *et al.*, 2012). De plus les CIK sont susceptibles

d'être préparés à partir de cellules mononucléées d'origine donneur prélevées chez un receveur présentant un chimérisme complément donneur en post-allogreffe. Cette possibilité permettrait de pallier les cas où il n'est pas possible de prélever une DLI chez le donneur du fait d'un refus (Zhong *et al.*, 2012).

Ces études cliniques suggèrent que les CIK sont une possibilité d'immunothérapie prometteuse et sûre pour le traitement de tumeurs malignes hématologiques en rechute après allogreffe de CSH. Des essais cliniques multicentriques sont nécessaires afin de valider cette approche thérapeutique et optimiser le protocole de traitement. Cette thérapie devrait être encore améliorée en augmentant la spécificité des cellules CIK par des approches d'ingénierie immunologique et génétique et l'identification de biomarqueurs prédictifs robustes pour la stratification des patients. Les stratégies pour activer et/ou étendre de cellules CIK pour immunothérapie adoptive sont résumées dans le Tableau 2 et Figure 6.

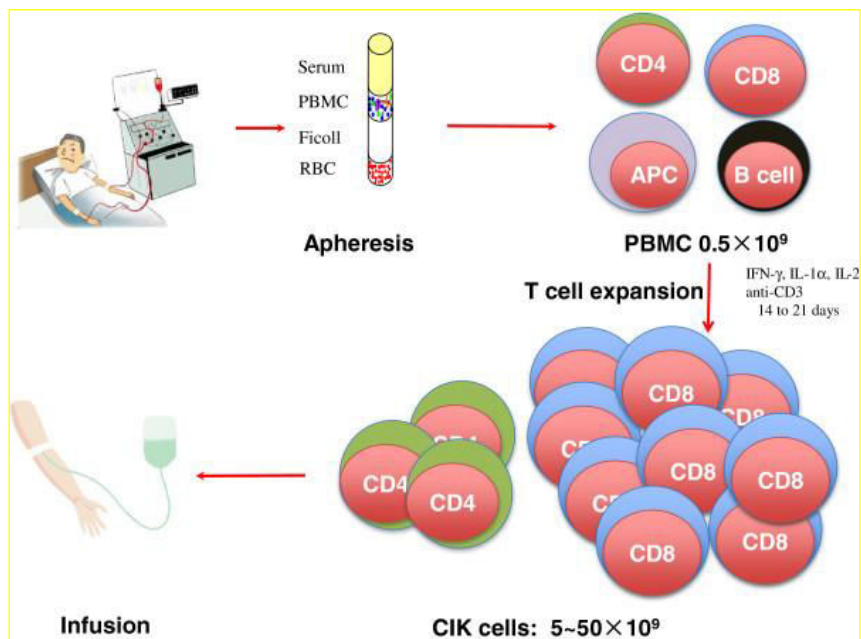


Figure 6. Procédure pour la préparation de CIK. Des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) sont isolées par aphérèse. Les cellules T sont activées, cultivées, et différenciées à l'aide d'un anti-CD3 en présence de cytokines, dont l'IFN- γ , IL-1 α , et IL-2 de 14 à 21 jours. Ces cellules T, communément appelées cytokine induced killer (CIK), sont ensuite perfusées chez les patients (Jiang *et al.*, 2013).

Chapitre III : Cellules NK

1. Présentation

a) Généralités

Les cellules NK sont des lymphocytes historiquement appelées «cellules tueuses naturelles» en raison de leur capacité apparemment spontanée à lyser des cellules tumorales ou infectées en l'absence d'immunisation spécifique préalable.

Cette propriété les distingue des autres lymphocytes tueurs, les lymphocytes T CD8 cytotoxiques, qui exercent, par l'intermédiaire de leur TCR, une cytotoxicité spécifique vis-à-vis de cellules présentant un épitope antigénique donné. Les cellules NK sont un des composants de l'immunité dite «innée».

Les cellules NK ont une morphologie de grands lymphocytes granuleux, avec un cytoplasme riche en granules lytiques. Elles sont caractérisées par l'expression des molécules CD56, CD16 et NKp46, et par l'absence d'expression de surface des membres de la famille CD3, ce qui les distingue des lymphocytes T. Cependant, les cellules NK sont hétérogènes sur le plan phénotypique. Différentes sous-populations de cellules NK expriment en effet des marqueurs de maturation et de différenciation distincts.

Les cellules NK sont présentes:

- dans la circulation sanguine, où elles représentent 5 à 15% des lymphocytes
- dans les organes lymphoïdes (rate, amygdales, ganglions périphériques)
- dans certains tissus (foie, poumon, placenta...) où elles exercent un rôle de sentinelle

Leur renouvellement dans le sang est d'environ deux semaines.

b) Origine et maturation des cellules NK

Les cellules NK proviennent de cellules précurseurs hématopoïétiques dans la MO (Colucci *et al.*, 2003) (Figure 7). Cependant, les cellules précurseurs hématopoïétiques sont également présentes dans les ganglions lymphatiques et les tissus lymphoïdes secondaires (Freud et Caligiuri, 2006), la decida maternelle (Vacca *et al.*, 2011), le thymus et le foie du foetus (Phillips *et al.*, 1992; Ikawa *et al.*, 1999). Néanmoins, le développement des cellules NK se produit principalement dans le microenvironnement médullaire.

D'une manière générale, les cellules NK sont issues de CSH CD34⁺ via différents stades de développement, tels que le précurseur de cellules NK (pNK), la cellule NK immature (iNK) et la cellule NK mature, et sont caractérisées par l'acquisition séquentielle des récepteurs de surface et de fonctions effectrices (Luevano *et al.*, 2012) (Figure 8). Les CSH donnent lieu à différentes lignées hématopoïétiques générées à partir de progéniteurs lymphoïdes communs et de progéniteurs myéloïdes communs. Les progéniteurs lymphoïdes communs se différencient en progéniteurs NK/T qui ont le potentiel de se développer en cellules T et/ou NK. Après cela, les cellules NK/T se différencient en pNK et iNK et enfin en NK matures (Freud et Caligiuri, 2006; Blom et Spits, 2006). Récemment, Grzywacz *et al.* ont montré que les cellules NK peuvent également être obtenues à partir de précurseurs myéloïdes tels que les progéniteurs myéloïdes communs et la population CD33⁺CD13⁺ (Grzywacz *et al.*, 2011). La transition de NK/T aux cellules pNK est définie par l'expression de l'IL-2/15R β (récepteur CD122) (Ikawa *et al.*, 1999). En même temps que l'expression de l'IL-2R β , l'IL-7, facteur de cellules souches et Flt3L (FMS-like tyrosine kinase 3 ligand) engagent les CSH vers la lignée NK (Williams *et al.*, 1998). Chez l'homme, pNKs sont caractérisées par le phénotype CD34⁺CD122⁺CD56⁻, et ces cellules pNK répondent alors à l'IL-15, un facteur critique pour la maturation finale des cellules NK.

Étant donné que les cellules se différencient à partir des cellules pNK aux cellules iNK,

l'expression de Flt3 et l'IL-7R α diminue, alors que l'expression de l'IL-2R β , CD2 et 2B4 (CD244) augmente (Yu *et al.*, 1998; Sivori *et al.*, 2002). Les cellules iNK sont identifiées par l'expression de CD161 qui une population de cellules CD3 $^{-}$ CD56 $^{-}$ CD161 $^{+}$ qui a notamment été retrouvée au cours de la différenciation des cellules NK *ex vivo* à partir de cellules souches issues de sang de cordon CD34 $^{+}$ Lin $^{-}$ (Lanier *et al.*, 1994). Bien que l'IL-15 soit connue comme étant indispensable au développement des cellules NK (Carson *et al.*, 1994; Cooper *et al.*, 2002), la génération de pNKs à partir de CSH est probablement un mécanisme IL-15 indépendante (Vosshenrich *et al.*, 2005). IL-15 et son récepteur spécifique, l'IL-15R, interviennent dans la différenciation de pNKs commises en cellules iNK (Roychowdhury *et al.*, 2005).

La maturation finale de cellules NK est caractérisée par l'acquisition de l'expression de récepteurs activateurs et inhibiteurs. Le récepteur activateur NKp44 est le premier récepteur des cellules NK à être exprimé au stade précoce de la maturation des cellules NK. Les récepteurs activateurs NKp46, NKp30, NKG2D et DNAM-1 sont acquis à un stade ultérieur. Le premier récepteur inhibiteur à exprimer *ex vivo* pendant la différenciation des cellules NK est CD94/NKG2A (Freud et Caligiuri, 2006).

Contrairement à ce qu'il a été pendant longtemps envisagé, les cellules NK doivent subir un processus «d'éducation» (appelé aussi «tuning», «licensing» ou «arming») qui va leur permettre de distinguer les cellules saines, des cellules anormales qui seront leurs cibles. Ce processus requiert une interaction initiale de certains de leurs récepteurs avec les molécules CMH-I du soi. Cette interaction implique que seules les cellules NK ainsi éduquées pourront ensuite être fonctionnellement compétentes, c'est-à-dire s'activer face à une cellule anormale (Kim *et al.*, 2005).

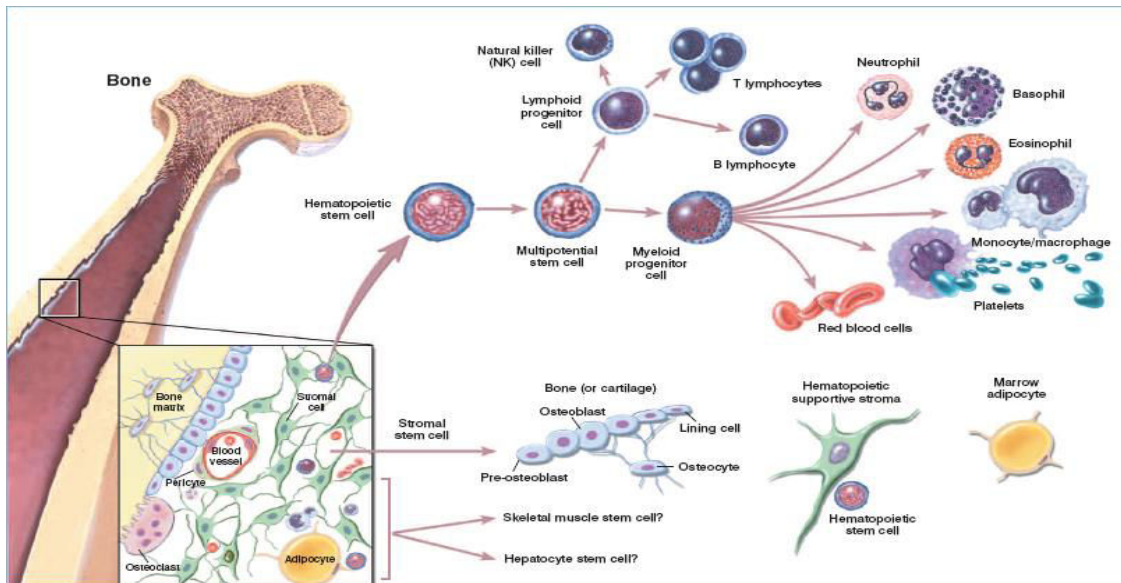


Figure 7. Origine des cellules NK (Terese Winslow, Lydia Kibiuk et Caitlin Duckwall, 2001).

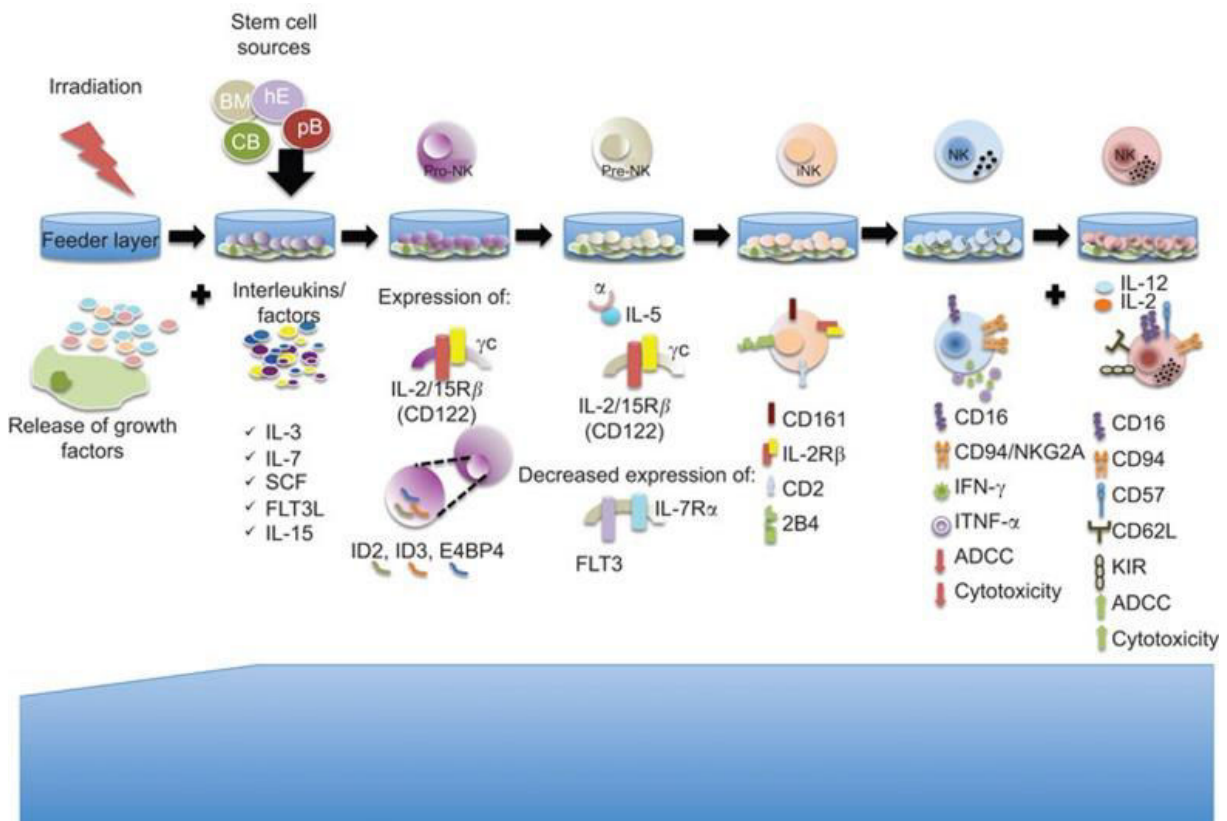


Figure 8. Production des cellules NK *ex vivo*. Les cellules NK peuvent être générées à partir de cellules souches. Les cellules souches isolées sont étalées sur une couche nourricière irradiée qui crée le microenvironnement pour le développement des cellules NK. L'addition de différentes interleukines (comme l'IL-7, IL-15, SCF, Flt3L) entraîne la différenciation vers la lignée cellulaire NK. Les cellules

subissent des phases différentes; la première étape (pro-NK) est caractérisée par l'expression de facteurs de transcription importants comme ID2, ID3 et E4BP4. Dans la deuxième étape, le SCF et Flt3L favorisent l'expression de récepteur IL-2/15 β , se qui augmente la réactivité à l'IL-15. La diminution de l'expression de l'IL-7R α et Flt3L sont caractéristiques de la phase de pré-NK. Par la suite, l'expression de CD161, CD2 et 2B4 reflète l'étape d'iNK. L'acquisition coordonnée des différents marqueurs d'activation et d'inhibition est suivie par une capacité de cytotoxicité accrue. Flt3L, ligand de FLT3; iNK, natural killer immature; NK, natural killer; SCF, facteur de cellules souches.

Les cellules NK humaines sont caractérisées par l'expression du CD56 et CD16, et l'absence du CD3 (Luevano *et al.*, 2012). Deux sous-populations distinctes de cellules NK humaines ont été identifiées en fonction de la densité d'expression du CD56 (Cooper *et al.*, 2001). La majorité (90%) des cellules NK humaines dans le sang périphérique est CD56^{dim} et exprime des niveaux élevés de CD16, une minorité (10%) étant CD56^{bright} et CD16^{dim/nég}. Ces sous-populations de cellules NK sont fonctionnellement distinctes. Les cellules CD56^{bright} sont des productrices de cytokines, tandis que les cellules CD56^{dim} sont cytolytiques et fonctionnent comme des effectrices efficaces de l'ADCC (Figure 9).

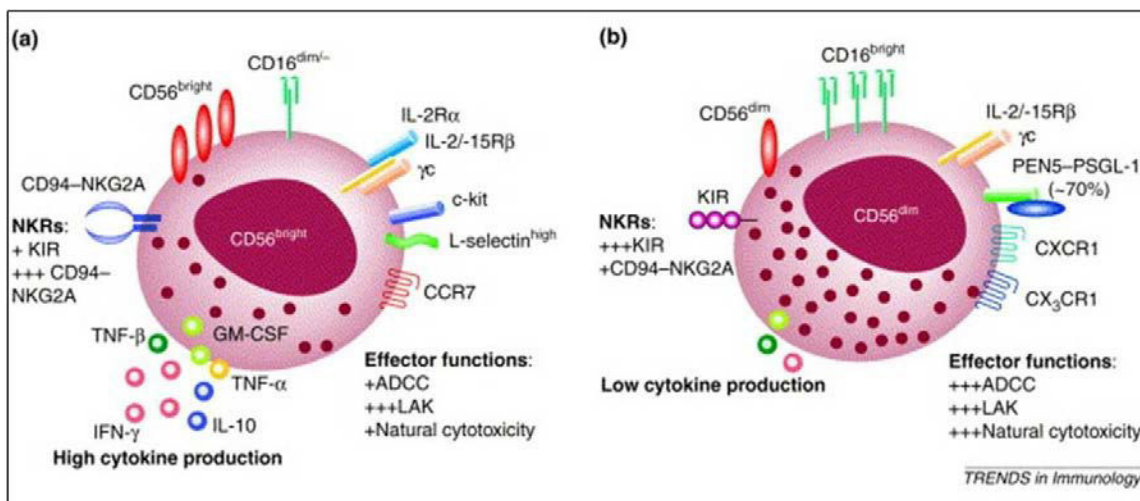


Figure 9. Schéma des sous-populations de cellules NK humaines. (a) Les cellules NK CD56^{bright} produisent des taux élevés de cytokines après stimulation. Cette sous-population présente une densité d'expression de CD16 faible et présente une cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) faible. (b) En

revanche, les cellules NK CD56^{dim} produisent des taux faibles de cytokines, sont médiateurs de l'ADCC, l'activité lymphokine-activated killer (LAK) et ont cytotoxicité naturelle puissante (Cooper *et al.*, 2001).

c) Fonctions

Les cellules NK sont des cellules «sentinelles» ayant pour vocation d'éliminer rapidement les cellules anormales (tumorales ou infectées), tout en respectant les cellules saines. La mise en place des fonctions NK est rapide car contrairement à celle des lymphocytes T et B, elle ne nécessite pas d'étape de prolifération ni de différenciation.

i. Cytotoxicité

La cytotoxicité directe des cellules NK vis-à-vis des cellules anormales est leur fonction la mieux connue. Elle peut s'exercer par différents mécanismes, en général similaires à ceux employés par les lymphocytes T CD8 comme la cytotoxicité dépendante de la perforine.

Des signaux d'activation et/ou d'inhibition sont générés au niveau du site de contact spécialisé formé entre les cellules NK et la cible, appelée la synapse immunologique (Figure 10). (Davis, 2002; Krzewski et Strominger, 2008; Orange, 2008). Une caractéristique unique des cellules NK humaines réside dans le fait, qu'en fonction de la cellule cible et des ligands des récepteurs de cellules NK qui sont reconnus, les cellules NK sont capables de former de nombreux types de synapses immunologiques, tels que des synapses d'activation, d'inhibition ou de régulation. Ces synapses jouent un rôle dans des fonctions spécialisées et varient dans l'organisation de l'espace entre les cellules, et peuvent différer des synapses immunologiques formées par d'autres cellules du système immunitaire (Krzewski et Strominger, 2008).

Suite à la reconnaissance de la cellule cible, la cellule NK dégranule: elle libère à la synapse le contenu de ses granules cytoplasmiques, en particulier la perforine qui forme des pores dans la membrane de la cellule cible.

D'autres mécanismes cytotoxiques conduisant à la mort de la cellule cible par apoptose sont possibles:

- interactions Fas (sur la cible)-Fas ligand (sur la cellule NK),
- interactions TRAIL-TRAIL récepteur
- libération de Granzyme B (serine estérase des granules)
- sécrétion de TNF- α (Tumor Necrosis Factor alpha) (Wallin *et al.*, 2003)

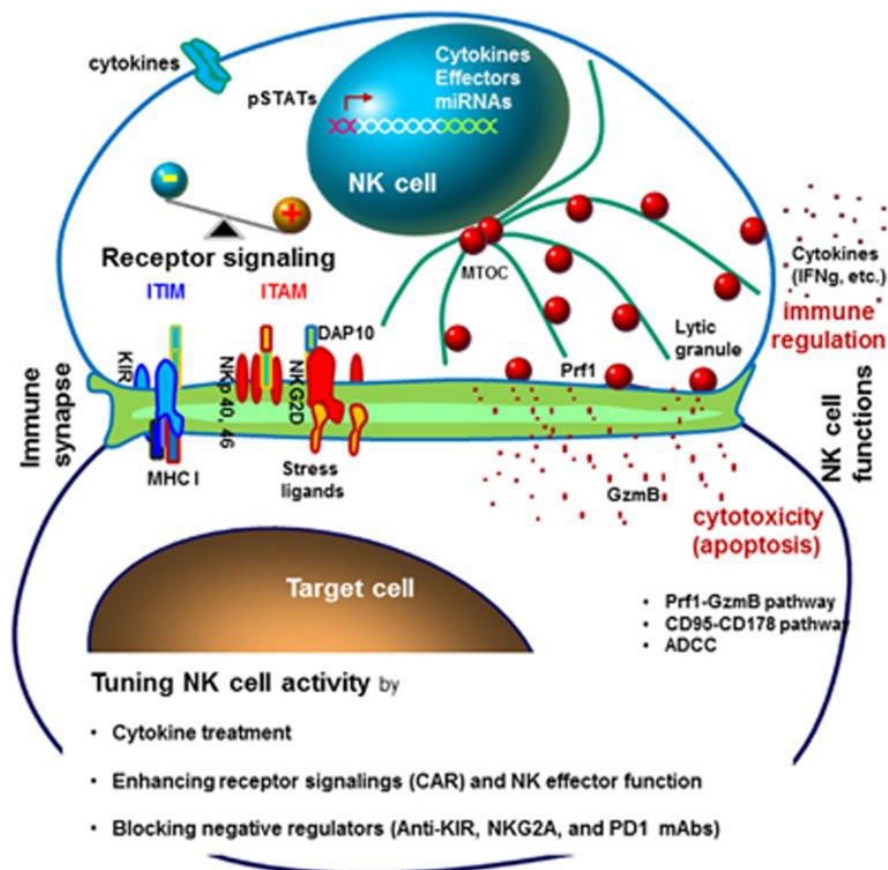


Figure 10. Activation des cellules NK. La rencontre entre les cellules NK et cellules cibles entraîne un phénomène d'adhésion et de conjugaison. De l'équilibre dynamique entre la signalisation des récepteurs inhibiteurs et activateurs au niveau de l'interface cellule-cellule dépend le résultat de la synapse. ADCC, cytotoxicité cellulaire dépendant des anticorps; CAR, récepteur de l'antigène chimère; GzmB, granzyme B; ITAM, immunoreceptor motif activateur à base de tyrosine; ITIM, immunoreceptor motif inhibiteur à base de tyrosine; KIR, killer cell immunoglobulin-like receptor; MHC, histocompatibilité majeur; MTOC, centre

de microtubules organisation; PD1, mort cellulaire programmée 1; Prfl, perforine; -, inhibition des cellules NK; +, activation des cellules NK (Yoon *et al.*, 2015).

ii. Production de cytokines

Les cellules NK produisent en particulier de l'IFN- γ , mais aussi du TNF- α , de l'IL-10, du GM-CSF et les β -chimiokines, CCL3 (MIP-1), CCL4 (MIP-1) et CCL5 (RANTES) (Figure 9).

Ces cytokines participent:

- à la régulation de la réponse inflammatoire, par exemple par le recrutement et l'activation de macrophages et de cellules dendritiques
- au contrôle direct de la réplication virale par la production d'IFN- γ
- au contrôle du type de réponse adaptative (orientation Th1/Th2/Treg) (Cooper *et al.*, 2001).

d) Reconnaissance des cellules cibles

Les cellules NK sont capables d'éliminer rapidement les cellules anormales (par exemple, tumorales ou infectées par un pathogène intracellulaire), tout en respectant les cellules saines. Cette capacité résulte d'un équilibre dynamique entre différents signaux activateurs et inhibiteurs transmis par des récepteurs membranaires (Figure 11).

Les cellules NK reconnaissent:

- le soi manquant (absence de molécules CMH-I) grâce à des récepteurs inhibiteurs
- des molécules de «détresse» sur les cellules anormales grâce à des récepteurs activateurs.

Ces récepteurs exercent leur fonction (inhibitrice ou activatrice) lorsqu'ils reconnaissent leurs ligands sur les cellules partenaires. L'intégration de la somme des signaux activateurs et inhibiteurs transmis par les récepteurs régule l'activation de la cellule NK suite à son interaction avec une cellule partenaire. La résultante de ces signaux détermine si la cellule NK

va exercer ou non ses fonctions de cytotoxicité et/ou de sécrétion de cytokines vis-à-vis de la cellule cible (Chiesa *et al.*, 2005).

i. Les récepteurs inhibiteurs

Les plus étudiés d'entre eux reconnaissent les molécules CMH-I du soi exprimées à la surface de quasiment toutes les cellules saines. En situation normale (non pathologique), les cellules NK «voient» le CMH-I sur les cellules saines et sont inhibées. Ce mécanisme garantit que les cellules saines soient préservées de la cytotoxicité NK. Une baisse d'expression des molécules CMH-I est perçue comme une modification de l'équilibre des signaux inhibiteurs/activateurs, et conduit à l'activation des fonctions effectrices NK. C'est la théorie du «soi manquant»

Une baisse d'expression des molécules CMH-I peut survenir:

- lors d'infection virale ou de transformation tumorale (mécanisme fréquent d'échappement à la réponse T cytotoxique des CD8).

- dans la situation de l'allogreffe, dans laquelle les cellules du greffon expriment des molécules CMH-I allogéniques donc différentes du soi, non reconnues par les récepteurs inhibiteurs spécifiques des molécules CMH-I du soi (Ljunggren et Karre, 1990).

ii. Les récepteurs activateurs

Outre l'expression des molécules du CMH-I, les cellules NK surveillent l'expression de ligands de leurs récepteurs activateurs à la surface des cellules cibles. Même si l'expression des molécules du CMH-I est normale, l'apparition ou la surexpression de ces ligands bouleverse l'équilibre des signaux activateurs/inhibiteurs, et conduit à l'activation des cellules NK.

iii. Spécificité des récepteurs NK

1) Récepteurs spécifiques du CMH-I

La diversité de spécificité des récepteurs spécifiques du CMH-I résulte probablement d'une pression de sélection exercée au cours de l'évolution par les virus, qui peuvent induire une baisse d'expression du CMH-I portant sur un groupe d'allèles, ou un locus CMH particulier. Ils appartiennent schématiquement à deux familles, donc chacune comprend des isoformes inhibitrices et activatrices.

Les Killer cell Ig-like Receptors (KIR) appartiennent à la superfamille des immunoglobulines et sont codés par une famille multigénique. Les différents membres de la famille KIR diffèrent par leur nombre de domaines extra-cellulaires (2 ou 3, d'où leur dénomination KIR2D ou KIR3D), et par la taille de leur fragment intracytoplasmique (long L ou short S, d'où leur dénomination KIR2DL, KIR3DL, suivie ensuite d'un numéro pour chaque membre du sousgroupe: KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3...).

Chaque récepteur est spécifique d'un groupe d'allèles du CMH-I. Par exemple:

- KIR2DL1 reconnaît environ la moitié des allèles HLA-C, ceux qui portent une Arginine en position 80 de leur séquence, alors que KIR2DL2 et KIRDL3 reconnaissent l'autre moitié des allèles HLA-C qui portent une Lysine en position 80.

- KIR3DL1 reconnaît une majorité d'allèles HLA-B.

- KIR2DL4 et KIR2DL5 sont les seuls membres avec une organisation de D0-D2 des domaines Ig-like se qui les distinguent de tous les autres KIR2D, ayant des domaines de type D1-D2 (Lanier, 2005).

Les ligands des formes activatrices sont parfois les mêmes que ceux des formes inhibitrices.

Les récepteurs CD94/NKG2 (A, B, C, E) appartiennent à la famille des C-lectines. Ils reconnaissent les molécules du CMH de classe I non classiques telles que HLA-E, qui sont exprimées à condition que les molécules classiques HLA-A, B ou C soient également

produites par la cellule. L'expression de HLA-E représente un contrôle de qualité supplémentaire des cellules saines puisqu'elle reflète le niveau d'expression des molécules CMH-I classiques.

2) Récepteurs non spécifiques du CMH-I

Il existe une grande variété de récepteurs ou co-récepteurs activateurs, spécifiques de ligands distincts. Tous ne sont pas exprimés sur les mêmes cellules NK. En fait, les cellules NK utilisent de manière variable tout un panel de récepteurs pour stimuler leurs fonctions effectrices.

Parmi les plus importants:

- CD16 est un récepteur pour le fragment Fc des IgG. Il est responsable du phénomène d'ADCC grâce auquel les cellules NK peuvent détecter et détruire des cellules cibles recouvertes d'anticorps (opsonisées).

- Les autres récepteurs activateurs des cellules NK reconnaissent des ligands exprimés sur les cellules dites en «détresse». Ces molécules d'alerte sont exprimées lors d'une infection virale, d'une transformation tumorale, mais également après des lésions de l'ADN ou un stress génotoxique...

Plusieurs récepteurs activateurs agissent le plus souvent de manière synergique pour induire les fonctions effectrices NK.

Parmi les plus importants:

- les récepteurs de la famille NCR (NKp30, NKp44 et NKp46)
- les récepteurs CD94/NKG2D, DNAM-1 et NKp80 jouent un rôle important dans la défense anti-virale et anti-tumorale (Moretta *et al.*, 2001).

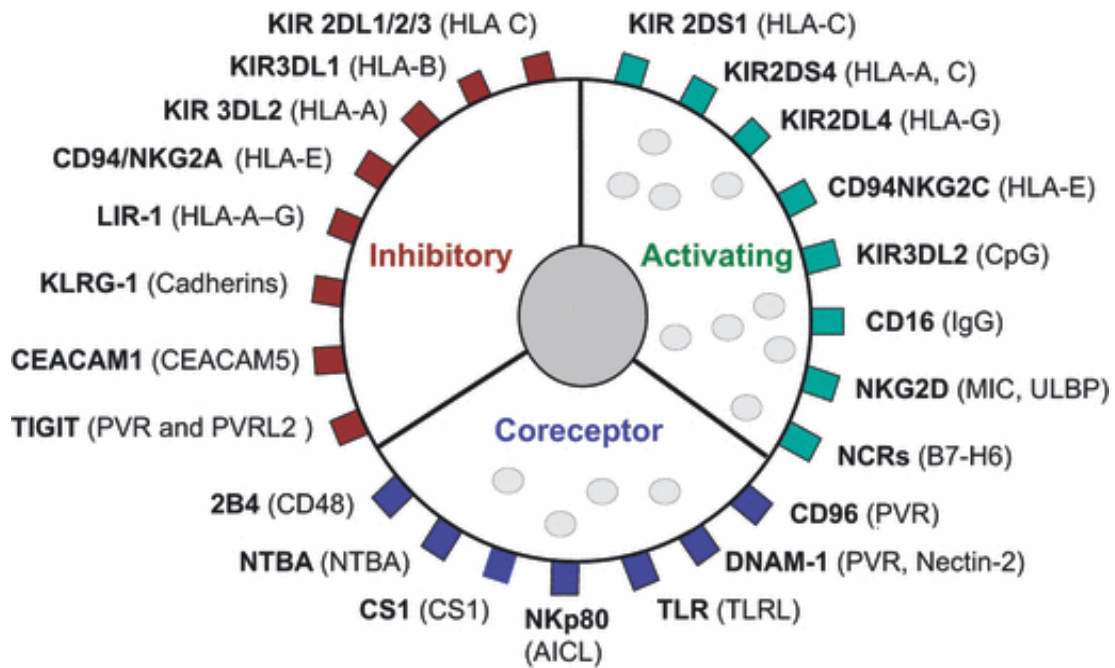


Figure 11. Récepteurs de surface des cellules NK et leurs ligands. Les récepteurs sont classés en fonction de leur fonction primaire (récepteurs inhibiteurs, récepteurs activateurs, et co-récepteurs activateurs). Les ligands connus sont indiqués entre parenthèses. Les autres familles de récepteurs ne sont pas représentées, y compris les récepteurs de cytokines (IFN- α , IL-1, -2, -12, -15, -18 et -21), les récepteurs chimiotactiques (CCR-2, -5, -7; CXCR- 1, -3, -4, -6, CX3CR1 et Chem23R), des récepteurs d'adhésion (CD2 et intégrines β 1 et β 2), et co-récepteurs inhibiteurs (CD300A, LAIR-1 et Siglec7) (Leung, 2011).

iv. Mécanismes d'activation/inhibition

Quand les récepteurs inhibiteurs engagent les molécules HLA en l'absence d'interaction d'un récepteur activateur/ligand, un signal négatif est généré, ce qui ne lyse pas de cellules cibles. A l'inverse, lorsque les récepteurs activateurs engagent leurs ligands sur les cellules cibles en l'absence d'interaction d'un récepteur inhibiteur/ligand, un signal d'activation est généré, ce qui entraîne la lyse des cellules cibles (Figure 12).

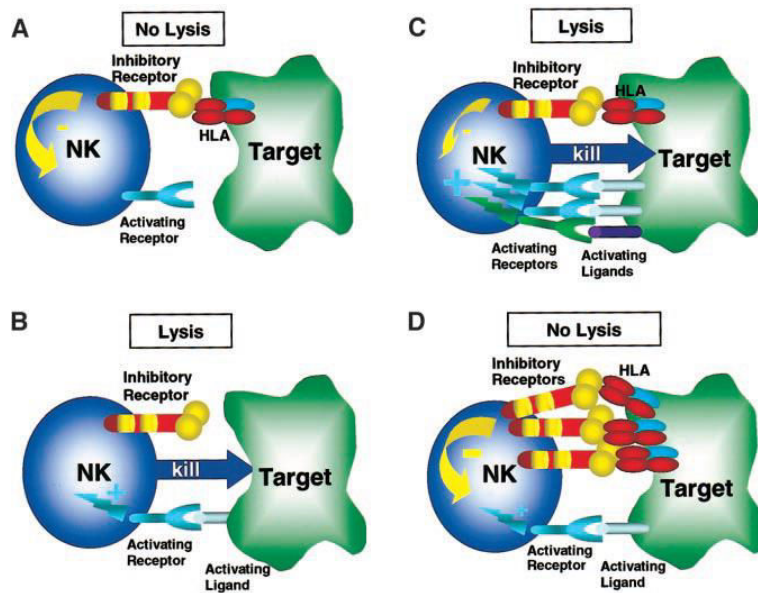


Figure 12. Régulation de la réponse des cellules NK par les récepteurs activateurs et inhibiteurs. Des récepteurs inhibiteurs (par exemple, inhibiteur KIR, CD94/NKG2A) reconnaissent leurs ligands, les molécules de classe I du CMH (HLA), sur la surface de la cellule cible tumorale, ce qui déclenche un signal d'inhibition. Des récepteurs activateurs (par exemple, activateur KIR, CD94/NKG2C, NKG2D) se lient aux ligands sur la surface de la cellule cible et activent des cellules NK et lysent des cellules cibles. A: Quand des récepteurs inhibiteurs engagent les molécules HLA en l'absence d'une interaction d'activateur/ligand, un signal négatif est généré, ce qui ne lyse pas des cellules cibles. B: A l'inverse, lorsque les activateurs engagent leurs ligands sur les cellules cibles en l'absence d'une interaction d'inhibiteur/ligand, un signal d'activation est généré, ce qui entraîne la lyse de cellules cibles. Ce scénario est opérationnel dans les cellules NK alloréactives dans le cadre de KIR épitope non-concordance. C: Prédominance du signal activateur par rapport au signal inhibiteur déclenchant la lyse. D: Prédominance du signal inhibiteur par rapport au signal activateur. Ce processus peut se produire en permanence lorsque les cellules NK sondent les tissus normaux de l'hôte (Farang *et al.*, 2002).

e) Alloréactivité des cellules NK dans l'allogreffe de CSH

Les cellules NK ont d'abord été reconnues pour leur capacité à lyser les cellules leucémiques chez la souris (Kiessling *et al.*, 1975; Herberman *et al.*, 1975). En 2002, Ruggeri *et al* ont démontré une meilleure survie sans maladie chez des patients atteints de LAM recevant des greffes de MO provenant de donneurs HLA haploidentiques exprimant des récepteurs KIR

qui reconnaissent des molécules du CMH classe I absentes chez l'hôte (Ruggeri *et al.*, 2002). Ces patients présentaient également une diminution de l'incidence de GVHD. La probabilité de survie chez les patients présentant un mismatch KIR-ligand était de 65% à 5 ans, contre seulement 5% pour les personnes sans un répertoire de cellules NK alloréactives.

Dans le modèle du soi manquant, les cellules NK du donneur expriment des récepteurs inhibiteurs KIR pour lesquels des molécules HLA de classe I sont absentes chez le receveur. Lors du transfert (ou le développement de CSH *in vivo*) ces cellules NK deviennent alloréactives car elles ne sont pas restreintes par le CMH de classe I. Fait intéressant, l'effet est le plus souvent limité aux patients atteints de LAM. Dans une large cohorte de plus de 2000 receveurs d'une transplantation de cellules hématopoïétiques HLA compatibles, Miller *et al* ont trouvé que le manque d'au moins un ligand de KIR chez le receveur conduit à moins rechute de LAM et de LMC. Dans une autre grande étude de 1770 patients, Hsu et ses collègues ont utilisé HLA-C groupe 1, groupe 2, et Bw6 comme marqueurs de ligands du receveur manquants, trouvant un effet bénéfique sur la rechute post-transplantation (Hsu *et al.*, 2006; Farag *et al.*, 2006; Kroge *et al.*, 2006; Miller *et al.*, 2007).

Grâce à une meilleure compréhension de l'organisation des KIR au niveau immunogénétique, chercheurs ont commencé à regarder l'impact du génotype KIR sur les résultats dans la greffe de CSH. Les gènes KIR peuvent être divisés en deux haplotypes principaux, A ou B (Pyo *et al.*, 2010). L'haplotype A est constitué de manière prédominante de KIR inhibiteurs et un seul KIR activateur, KIR2DS4. L'haplotype B contient des KIR inhibiteurs et plusieurs activateurs qui peuvent être subdivisés en deux régions distinctes, centromérique (Cen) ou télomérique (Tel). Les KIR activateurs, comme KIR2DS1, sont susceptibles d'être impliqués dans les effets anti-leucémiques des cellules NK. Il a été démontré que la signalisation par ce récepteur peut surmonter des signaux inhibiteurs médiés par le NKG2A (Foley *et al.*, 2008; Venstrom *et*

al., 2012).

McQueen et Parham ont été les premiers à signaler que les transplantations provenant de donneurs KIR A/A chez des receveurs B/x ont conduit à une diminution de la survie lors de greffes HLA compatibles (McQueen *et al.*, 2007). Lors de l'utilisation de greffes déplétées en cellules T, l'haplotype KIR B (gènes pour KIR2DS1, KIR3DS1 et KIR2DL5A) a réduit le taux de rechute et a amélioré l'OS (Stringaris *et al.*, 2010). Cet effet était spécifique a été observé surtout dans le cas des LAM. Dans de grandes cohortes de patients, il a été montré que ceux qui ont reçu des greffes de donneurs homozygotes pour l'haplotype B centromérique (Cen-B/B, contenant plus de KIR activateur) avaient des taux inférieurs de rechute avec amélioration de l'OS (Cooley *et al.*, 2009). Ces données sont en cours d'évaluation dans un essai prospectif pour sélectionner les «meilleurs» donneurs sur le genotype KIR chez les patients atteints de LAM pour qui des greffes de CSH de donneurs non apparentés sont prévues (essai NCT01288222).

Dans les greffes de CSH, la manipulation de la fonctionnalité des cellules NK pendant la reconstitution immunitaire pourrait améliorer encore l'effet GVL. Lors de la reconstitution hématopoïétique, les cellules NK sont les premières cellules à se régénérer et sont fonctionnellement immatures, exprimant des taux élevés de NKG2A/CD94 et des taux faibles de KIR inhibiteurs (Nguyen *et al.*, 2005; Vago *et al.*, 2008). Foley *et al* ont trouvé qu'indépendamment de la source de cellules souches (non manipulée, CD34⁺ sélectionnées ou UCB), les cellules NK sont non fonctionnelles dès le début de la récupération hématopoïétique. Dans chacun des groupes, la capacité de produire de l'IFN- γ en réponse à des cellules cibles malignes a été supprimée. La fonctionnalité des cellules NK est rétablie généralement six mois après la transplantation, sauf dans le groupe greffé avec des sangs de cordon (Foley *et al.*, 2011). Cette différence est cohérente avec le fait que l'expression de

NFAT (qui entraîne la production d'IFN- γ) est plus faible dans les lymphocytes dérivés de sang de cordon (Kaminski *et al.*, 2003). Dans ces études et d'autres, l'amélioration de la fonctionnalité des cellules NK serait due à l'expression des KIR et corrélée à l'interaction de haute affinité entre les récepteurs KIR et les molécules HLA. D'autre part, il a également été démontré que les lymphocytes T dans la greffe peuvent jouer un rôle dans le développement des cellules NK et d'expression KIR (Shilling *et al.*, 2003; Nguyen *et al.*, 2008; Foley *et al.*, 2011) et que ce processus est facilité lorsque les greffes sont déplétées en cellules T (Fehniger *et al.*, 2003).

2. Source des cellules souches pour la production de cellules NK

a) Cellules NK dérivées du sang périphérique mobilisé et les cellules souches de la MO

La MO peut être utilisée comme source de cellules souches pour la différenciation des cellules NK. Cependant, elles sont en nombre limité et difficiles à maintenir à long terme en culture. Les cellules souches de MO ont été précédemment utilisées pour étudier l'ontogenèse des cellules NK. Les résultats suggèrent que le contact intime avec les cellules stromales est nécessaire pour que les progéniteurs primitifs puissent se différencier en cellules NK (Luevano *et al.*, 2012). Shibuya *et al.* ont déterminé les cytokines pour la différenciation des cellules CD34⁺ progénitrices hématopoïétiques (Shibuya *et al.*, 1995). Ils ont mis en culture des cellules souches de MO pendant 28 jours en utilisant de l'IL-2 et du stem cell factor (SCF), le ligand kit ou facteur steel, les cellules CD34⁺CD33⁺ se sont différenciées en cellules NK CD16⁻. Bien que le groupe ait tenté de démontrer que les cellules stromales ne sont pas nécessaires pour la production des cellules NK, les pourcentages de cellules NK obtenus étaient très faibles, ce qui suggère un rôle critique des cellules stromales dans la différenciation des cellules NK *ex vivo*.

Les cellules souches peuvent être mobilisées en utilisant le G-CSF pour faciliter leur prélèvement (Petit *et al.*, 2002). Giuliani *et al.* ont utilisé des cellules souches du sang périphérique pour étudier l'importance de l'IL-15 fixée à la membrane dans l'engagement en faveur de la différenciation des cellules NK (Giuliani *et al.*, 2008). De façon surprenante, ils ont trouvé que l'IL-15 fixée à la membrane favorise la création d'une nouvelle sous-population de cellules NK, les NK-ireg. Cette sous-population exprime HLA-G et sécrète de l'IL-10 et l'IL-21. Sa génération est strictement dépendante de la trans-présentation de l'IL-15 exprimée exclusivement par les progéniteurs hématopoïétique du sang périphérique. En 2010, Yoon *et al.* ont développé un protocole pour générer des cellules NK en utilisant des cellules CD34⁺ isolées à partir du sang périphérique mobilisé. Ce protocole de différenciation était basé sur IL-15 et IL-21 et ont administré ces cellules NK différenciées *ex vivo* après une allogreffe haploidentique (Yoon *et al.*, 2010). Le nombre de cellules NK disponibles après culture était de $9,28 \times 10^6$ cellules/kg. Récemment, Choi *et al.* ont également mis au point un nouveau protocole pour la production de cellules NK à l'aide de cellules T appauvries en cellules du sang périphérique mobilisé qui permet une période de temps plus courte de la différenciation et de la génération du nombre de cellules NK plus important par rapport au protocole précédent (Choi *et al.*, 2014).

b) Cellules NK dérivées de cellules souches pluripotentes

Les cellules souches pluripotentes fournissent une source supplémentaire de cellules NK. Celles-ci comprennent les cellules souches embryonnaires humaines (hESCs: human embryonic stem cells) et les cellules souches pluripotentes induites (iPSCs: induced pluripotent stem cells) (Woll *et al.*, 2009; Knorr *et al.*, 2010). Une méthode pour produire des cellules NK à partir de hESCs et iPSCs adaptée au transfert clinique a été récemment décrite

(Knorr *et al.*, 2013). Contrairement aux cellules NK dérivées de cellules souches de sang de cordon CD34⁺ ou des lignées de cellules NK, les cellules NK dérivées d'iPSC maintiennent des niveaux élevés d'expression de CD16 et de KIR. En utilisant cette méthode de différenciation améliorée, il estime qu'une plaque de 6 puits de hESCs ou iPSC pourrait fournir suffisamment de cellules NK pour traiter plusieurs patients aux doses de NK habituellement utilisées (Miller *et al.*, 2005; Knorr *et al.*, 2013). La production de cellules NK à partir d'iPSC présente également d'autres avantages: (1) une source illimitée de cellules NK au typage KIR connu pour l'immunothérapie adoptive, (2) une fonctionnalité élevée dans des modèles animaux précliniques, et (3) une plateforme génétiquement prête pour adapter la thérapie basée sur le cancer du patient par l'intermédiaire des récepteurs spécifiques du tumeur (TCRs ou récepteurs chimériques d'antigènes (CARs: chimeric antigen receptor)) (Themeli *et al.*, 2013). À l'heure actuelle, cependant, l'utilisation d'iPSCs propres au patient n'a pas atteint le stade clinique. Les cellules NK issues d'une tierce partie dérivées d'iPSC sont soumises à un rejet immunitaire par le receveur. Pour contourner cette limite, la modulation génétique spécifique doit être utilisée pour diminuer l'immunoréactivité des cellules infusées (Torikai *et al.*, 2013).

c) Cellules NK dérivées du sang de cordon

Les cellules progénitrices hématopoïétiques du sang de cordon peuvent être utilisées pour étudier le développement de cellules NK humaines (Grzywacz *et al.*, 2006). Des doses cliniquement appropriées de cellules NK dérivées de sang de cordon peuvent être générées avec (Grzywacz *et al.*, 2006) et sans utilisation de cellules nourricières (Spanholtz *et al.*, 2011; Shah *et al.*, 2013). Les cellules NK ainsi générées contiennent un mélange de cellules immatures et matures, qui produisent des cytokines et sont cytotoxiques (Gumá *et al.*, 2004).

Le développement des cellules NK fonctionnelles (par exemple l'isolement des cellules CD34⁺, l'expansion *ex vivo*) peut prendre jusqu'à quatre semaines et nécessite une production dans un établissement conforme aux bonnes pratiques de fabrication (GMP: good manufacturing practice).

3. Méthodes de tri

Minimiser la contamination des lymphocytes T CD3⁺ dans les injections de cellules NK est nécessaire pour assurer la sécurité, la pureté et l'efficacité des cellules NK (Lapteva *et al.*, 2014). La présence de cellules T parmi des cellules NK destinées à une utilisation clinique est indésirable en raison du risque de GVHD, en particulier lorsque le donneur est haploidentique (Denman *et al.*, 2012). Des critères de libération doivent être établis en ce qui concerne la teneur résiduelle en lymphocytes T CD3⁺ dans le produit final quelque soit la méthodologie de fabrication des cellules NK. Les critères de pureté varient d'une étude à l'autre en raison du processus de fabrication (Pittari *et al.*, 2015). La dose de cellules T tolérée est généralement fixée à moins de 10⁵ /kg cellules CD3⁺CD56⁻ (Shi *et al.*, 2008).

L'élimination des lymphocytes T CD3⁺ peut être effectuée à tous les stades de l'expansion des cellules NK. Denman *et al* n'ont rapporté aucune différence dans la prolifération des cellules NK lorsque l'élimination des cellules T CD3⁺ a été effectuée avant et après expansion (Denman *et al.*, 2012). Toutefois, l'élimination des lymphocytes T tardivement au cours du processus d'expansion est souvent moins efficace et plus coûteuse en raison d'un plus grand nombre de réactifs et de grandes colonnes requis. Le meilleur moment pour effectuer l'élimination des cellules T devrait prendre en compte le nombre de cellules au départ, le rendement attendu en cellules NK purifiées (Lapteva *et al.*, 2012). L'élimination des lymphocytes B CD19⁺ contaminants a également été employée pour à la fois améliorer la

pureté des cellules NK et éviter la survenue d'un syndrome lymphoprolifératif post-greffe dû aux lymphocytes B du donneur infectés par le virus d'Epstein-Barr (Miller, 2013).

La purification de grade clinique des cellules NK pour l'immunothérapie adoptive peuvent être également être améliorée par l'ajout d'une étape de sélection positive tel que l'enrichissement en cellules CD56⁺ (Lang *et al.*, 2002; Iyengar *et al.*, 2003; Passweg *et al.*, 2004; McKenna *et al.*, 2007; Koehl *et al.*, 2013). Cependant, le rendement de sélection des cellules est plus faible lorsque l'enrichissement en CD56 est utilisé (Sutlu et Alici, 2009). L'analyse immunophénotypique des antigènes des cellules NK (CD56 et CD16) et des antigènes des cellules T (CD3, CD4 et CD8) (Shi *et al.*, 2008; Somanchi *et al.*, 2011; Denman *et al.*, 2012; Koehl *et al.*, 2013) peut être utilisée pour déterminer si la composition cellulaire spécifique du produit est située dans les limites fixées pour les critères de libération.

4. Méthodes d'amplification

Jusqu'à récemment, l'immunothérapie adoptive à base de cellules NK est restée largement inexplorée en raison du petit nombre de cellules NK isolé après une procédure d'aphérèse typique et l'incapacité à développer de manière fiable un grand nombre de cellules NK *ex vivo*. À l'heure actuelle, le seuil du nombre de cellules NK à reinjecter pour obtenir un effet antitumoral n'est pas clairement défini. Les cultures cellulaires à court et à long terme contenant des cytokines sans cellules nourricières, telles que l'IL-15 et l'IL-2, administrées seules ou en combinaison avec d'autres facteurs de croissance, entraînent généralement de petites expansions de cellules NK *ex vivo* (Klingemann et Martinson, 2004; McKenna *et al.*, 2007). En général, pour éviter la contamination et la prolifération de cellules T et de cellules NKT, les cellules T sont en général déplétées à partir de PBMC soit avant l'initiation de la culture des cellules NK ou à la fin de la culture (Lapteva *et al.*, 2012). Les stratégies pour

activer et/ou étendre les cellules NK en vue d'une administration chez les patients atteints de cancers sont résumées dans les Figures 13 et 14.

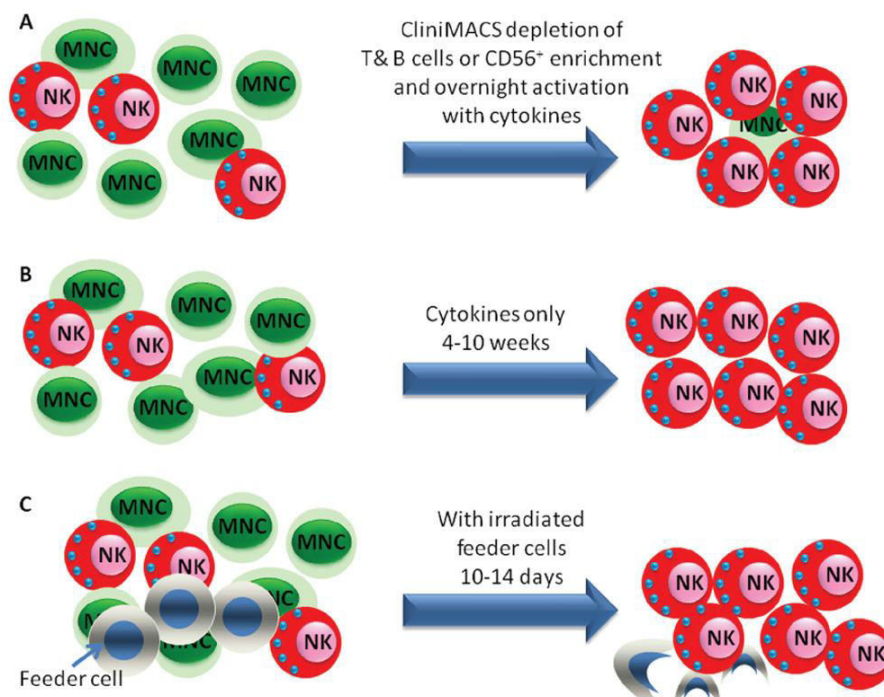


Figure 13. Les cellules NK de grade clinique sont généralement issues de produits d'aphérèse frais ou congelés. (A) Un dispositif de tri de type CliniMACS peut enrichir cellules CD56⁺ par dépletion des sous-populations de cellules non-NK (lymphocytes T et B), la sélection positive en utilisant des billes anti-CD56 ou les deux stratégies peuvent être utilisées sur le même produit pour obtenir une meilleure pureté. Les cellules NK enrichies par CliniMACS sont infusées directement ou après activation pendant une nuit avec de l'IL-2. (B) Un cocktail de cytokines ou (C) l'addition de cellules nourricières peuvent permettre une expansion plus rapide (Lapteva *et al.*, 2014).

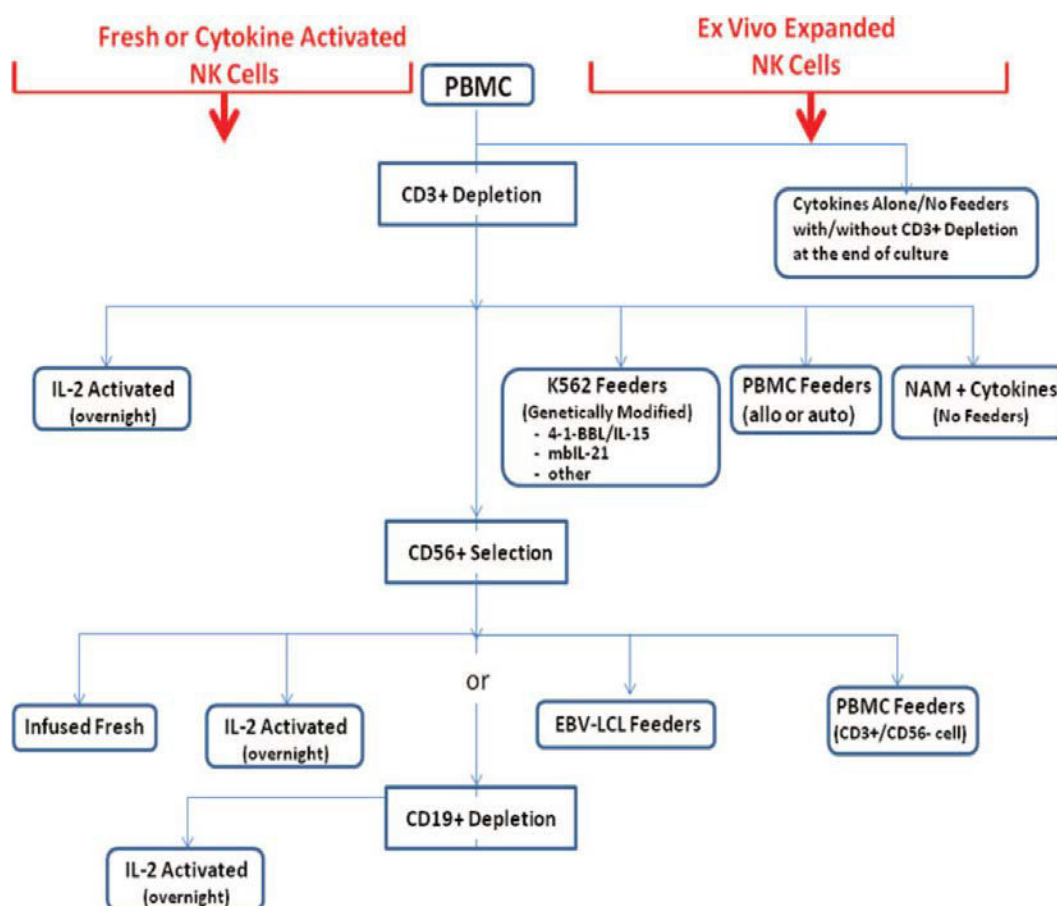


Figure 14. Stratégies pour activer et/ou éxpanre les cellules NK pour immunothérapie adoptive chez les patients atteints de cancer (Childs et Berg, 2013).

a) Cellules NK activées par des cytokines

Les cellules NK dépendent de cytokines pour leur développement, leur survie et leurs fonctions (Romee *et al.*, 2014; Yoon *et al.*, 2015). L'utilisation clinique de cytokines est d'un grand intérêt en raison de leur rôle dans le maintien et/ou l'activation du potentiel anti-tumoral. Les cytokines, notamment l'IL-2, -12, -15, -18 et -21, influencent les propriétés des cellules NK (Tableau 4) (Romee *et al.*, 2014; Yoon *et al.*, 2015).

L'IL-2 et l'IL-15 sont les cytokines activatrices les plus étudiées (Rosenberg, 2000; Fehniger et Caligiuri, 2001; Fehniger *et al.*, 2002; Becknell et Caligiuri, 2005; Waldmann, 2006). Elles peuvent améliorer la réponse antitumorale (Romee *et al.*, 2014), et lorsqu'elles

sont combinées *ex vivo*, elles exercent des effets additifs sur la stimulation des cellules NK (Seidel *et al.*, 1998). Lorsqu'elles sont combinées, l'IL-2 et l'IL-12 synergisent pour stimuler la cytotoxicité des cellules NK *ex vivo* (DeBlaker-Hohe *et al.*, 1995). La stimulation des cellules NK par l'IL-12, -15, et -18 génère des cellules NK de type mémoire, qui persistent à long terme et présentent une fonctionnalité améliorée lorsqu'elles sont restimulées, produisant beaucoup plus d'IFN- γ (Cooper *et al.*, 2009; Berrien-Elliott *et al.*, 2015).

L'IL-2 est l'une des premières cytokines utilisées en clinique pour induire un effet antitumoral (Rosenberg *et al.*, 1987; Rosenberg, 2005; Romee *et al.*, 2014). L'IL-2 joue un rôle immunorégulateur pour les lymphocytes, et malgré l'absence d'impact direct sur les cellules cancéreuses, elle peut stimuler les réactions immunitaires dirigées contre des antigènes du cancer (Rosenberg, 2005). Les cellules NK activées avec l'IL-2 *ex vivo* peuvent lyser des cibles tumorales qui ne sont pas normalement sensibles à leur action (par exemple, des cibles résistantes aux cellules NK) (Robinson et Morstyn, 1987). Lorsque incubés avec IL-2 pendant longues périodes, les produits contenant des cellules NK présentent des quantités importantes de cytokines pro-inflammatoires dont l'IFN γ et le TNF α , qui ont été associés à une hypotension et des frissons chez les patients traités (Shi *et al.*, 2008). Cette cytokine seule ne peut supporter la prolifération des cellules NK, mais elle agit en synergie avec des cellules nourricières ou des CPA artificielles pour l'expansion des cellules NK efficaces *ex vivo* (Rabinowich *et al.*, 1991; Fuchshuber *et al.*, 1991; Boissel *et al.*, 2008; Somanchi *et al.*, 2011; Denman *et al.*, 2012).

L'IL-2 peut être administrée par voie systémique après injection de cellules NK pour soutenir la survie des cellules NK *in vivo* (Shi *et al.*, 2008). Cependant, le traitement avec une faible dose d'IL-2 ne semble pas être très efficace (Sutlu et Alici, 2009), alors que le traitement avec une dose élevée peut entraîner des effets toxiques chez les patients (Shi *et al.*,

2008). Également, l'administration d'IL-15 en bolus provoque des symptômes inflammatoires aigus tels que de la fièvre, de l'hypotension et une cytopénie transitoire (Conlon *et al.*, 2015).

Tableau 4. Interleukines clés et leurs rôles en ce qui concerne les cellules NK (Baggio *et al.*, 2016)

Interleukine	Rôle en ce qui concerne les cellules NK
IL-2	Rôle dans l'activation et l'expansion <i>in vivo</i> (Romee <i>et al.</i> , 2014) et de la survie <i>in vitro</i> (Loza <i>et al.</i> , 2002), induit l'activation, déclenche une réponse anti-tumorale et régule à la hausse l'expression d'IL-12 (Sutlu et Alici, 2009)
IL-4	Rôle dans la survie (Loza <i>et al.</i> , 2002) et la prolifération (Robertson <i>et al.</i> , 1996; Loza <i>et al.</i> , 2002)
IL-7	Augmentation de la prolifération cellulaire (Robertson <i>et al.</i> , 1996)
IL-10	Augmentation de la cytotoxicité <i>ex vivo</i> et de l'expression des gènes liées à la migration cellulaire (Mocellin <i>et al.</i> , 2004)
IL-12	Augmentation de la prolifération (Robertson <i>et al.</i> , 1996). Induit l'activation (Sutlu et Alici, 2009), la différenciation et la production d'IFN- γ (Loza <i>et al.</i> , 2002); et augmente l'activité cytotoxique (Romee <i>et al.</i> , 2014)
IL-15	Favorise la prolifération et de la survie <i>ex vivo</i> (Loza <i>et al.</i> , 2002; Pittari <i>et al.</i> , 2015), soutient la maturation (Loza <i>et al.</i> , 2002), et induit l'activation (Sutlu et Alici, 2009)
IL-18	Peut être impliquée dans la maturation finale fonctionnelle pour la production d'IFN- γ (Pittari <i>et al.</i> , 2015)
IL-21	Améliore la réponse proliférative (Pittari <i>et al.</i> , 2015) et l'activité cytotoxique (Romee <i>et al.</i> , 2014; Pittari <i>et al.</i> , 2015), augmente l'expression de l'IFN- γ , la perforine, et le granzyme B (Romee <i>et al.</i> , 2014)

Remarque: toutes les études citées dans le tableau n'ont pas été utilisées *in vivo* ou utilisées sur des cellules humaines.

b) Type de cellules nourricières (feeders)

Plusieurs méthodes différentes (Figure 12) utilisant des cellules nourricières ou des CPAs ont été développées récemment pour obtenir un grand nombre de cellules NK hautement

activées *ex vivo*. Des PBMCs irradiés, des lignées de cellules lymphoblastoïdes transformées par le virus d'Epstein-Barr (LCL-EBV), des cellules K562 génétiquement modifiées exprimant des molécules stimulatrices de cellules NK telles que ligand 4-1BB et de l'IL-15 liée à la membrane et d'autres lignes cellules tumorales irradiées sont couramment utilisées en tant que cellules nourricières dans les cultures de cellules NK (Harada *et al.*, 2004; Imai *et al.*, 2005; Berg *et al.*, 2009; Shook et Campana, 2010). L'utilisation de cellules nourricières dans des cultures de cellules NK permet d'améliorer considérablement l'expansion de cellules NK *ex vivo*, et cette technique a été utilisée récemment pour le développement à grande échelle de cellules NK de grade clinique (Fujisaki *et al.*, 2009; Lapteva *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2013). Cependant, il existe des différences phénotypiques et fonctionnelles substantielles observées entre les populations de cellules NK d'isolées fraîchement, activées par IL-2, et d'élargies *ex vivo*, ce qui pourrait théoriquement avoir un impact sur leur efficacité thérapeutique après administration (Fujisaki *et al.*, 2009; Lapteva *et al.*, 2012). Les critères pour la libération de cellules NK activées par des cytokines et expansées *ex vivo* varient selon les institutions et dépendent du contexte clinique dans lesquelles elles sont utilisées. Par exemple, les protocoles utilisant des infusions de cellules NK allogéniques issues de donneurs d'HLA-incompatibles imposent souvent une contamination en cellules T totales/kg de moins de $1-5 \times 10^5$ pour empêcher la survenue de GVHD grave (Curti *et al.*, 2011; Szmania *et al.*, 2012), tandis que les cellules NK administrées dans le cadre d'une perfusion autologue peuvent contenir plus de cellules T.

i. Cellules NK cultivées en présence de LCL-EBV irradiées.

Les LCL-EBV sont utilisées depuis des décennies pour induire la prolifération des cellules NK *ex vivo* (Hercend *et al.*, 1982; Perussia *et al.*, 1987; Rabinowich *et al.*, 1991). Les

données précliniques de Berg *et al* ont établi qu'un grand nombre de cellules NK (99% CD3⁻/CD56⁺) pouvait être obtenu à partir de PBMC enrichis en cellules NK après une déplétion des cellules T CD3⁺ suivi d'une sélection des cellules NK CD56⁺ (Berg *et al.*, 2009). L'expansion optimale a été obtenue par co-culture des cellules NK enrichies avec une lignée de cellules nourricières d'EBV-LCL de grade-clinique irradiées à 100 Gy (ratio cellules nourricières/cellule NK 20:1) dans le milieu X-VIVO 20 contenant 10% de sérum albumine (SAB) humaine et 500 IU/mL d'IL-2 pendant 28 jours. En utilisant cette technique, les cellules NK ont été expansées 800 à 1000 fois. L'expansion *ex vivo* a conduit à une augmentation significative de l'expression de CD56, TRAIL, FasL, NKG2D, NKp30, NKp44, de LFA-1, NKG2C, CD244, et CD158b et NKp46. Une augmentation de l'expression intracellulaire de granzymes A et B et des niveaux plus élevés d'IFN γ , IL-2, FasL, et TRAIL ont également été observés (Berg *et al.*, 2009).

Sur la base de ces données précliniques, Lundqvist *et al* ont utilisé cette méthode pour un essai clinique de phase 1 évaluant la sécurité et l'efficacité de l'administration de cellules NK autologues cultivées *ex vivo* après le traitement avec le bortézomib pour sensibiliser les tumeurs à la cytotoxicité des cellules NK (Lundqvist *et al.*, 2006; 2009; et 2010). Le taux médian d'expansion des cellules NK obtenues en présence de cellules nourricières d'EBV-LCL irradiées a été de 3,637 fois après 19 à 22 jours de culture *ex vivo*. A l'exception d'une thyroïdite et d'un patient ayant développé une hypoxie transitoire suite à après la perfusion de $2,5 \times 10^8$ cellules NK/kg le jour 5, les cellules NK expansées *ex vivo* ont été bien tolérées.

ii. Cellules NK élargies en utilisant des PBMC irradiées.

Des PBMC allogéniques irradiées ont été utilisées pendant des années pour développer des cellules T à des fins d'immunothérapie adoptive chez l'homme, y compris des TIL et des

lignées de cellules T spécifiques de l'antigène. Des PBMC allogéniques irradiées peuvent également être utilisées comme cellules nourricières afin d'expander les cellules NK *ex vivo*, bien que les taux d'expansion avec des PBMC soient inférieurs à ceux obtenus en utilisant des lignées transformées par l'EBV ou des cellules K562 modifiées génétiquement (Luhm *et al.*, 2002; Berg *et al.*, 2009). Berg *et al* ont constaté que lorsque des PBMC allogéniques ont été utilisées comme cellules nourricières, le nombre de cellules NK pouvait être multiplié par 100 en 15 jours et, après un deuxième cycle d'expansion de 14 jours, par 200 à 400, même si les résultats variaient en fonction du donneur de cellules NK. Les PBMC autologues irradiées peuvent également être utilisées comme cellules nourricières pour stimuler l'expansion des cellules NK *ex vivo* (Siegler *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2013). En utilisant cette approche, une population hautement purifiée des cellules NK pouvait être multipliée par 300 quand les cellules NK ont été obtenues à partir de donneurs sains et par 169 lorsqu'elles ont été isolées à partir de patients atteints de cancer. Notre groupe a décrit également une technique immunomagnétique basée sur une déplétion CD3/CD19 pour obtenir un produit enrichi en cellules NK et puis suivie d'une expansion avec des cellules de la fraction non-NK irradiées à 25 Gy utilisées en tant que cellules nourricières (Decot *et al.*, 2010). L'IL-2 et l'IL-15 étaient équivalentes à améliorer significativement la cytotoxicité des cellules NK envers les cellules K562 après la culture. De plus, une modification du profil d'expression des récepteurs des cellules NK a été observée avec augmentation du NKG2D, mais aussi des récepteurs inhibiteurs KIR2DL1 et KIR2DL2 (Decot *et al.*, 2010).

iii. Cellules NK élargies en utilisant des cellules K562 modifiées génétiquement irradiées.

La lignée K562, déficiente en CMH de classe I, peut également être utilisée en tant que

cellules nourricières pour induire la prolifération des cellules NK *ex vivo* (Imai *et al.*, 2005; Fujisaki *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2011; Lapteva *et al.*, 2012). Imai *et al* ont transfecté rétroviralement cette lignée avec une construction contenant deux molécules stimulatrices des cellules NK, le ligand d'une molécule de surface activatrice 4-1BB (CD137), et le gène de l'IL-15 humaine fusionné à la protéine fluorescent verte (GFP: green fluorescent protein) et un gène codant pour le domaine transmembranaire CD8 α , permettant l'expression membranaire de l'IL-15. Ces cellules K562 génétiquement modifiées coexprimant l'IL-15 à la membrane et le ligand de 4-1BB et sont très efficaces pour induire la prolifération des cellules NK *ex vivo*. Une co-culture de 7 jours des cellules NK purifiées par déplétion CD3 et enrichissement CD56 avec la lignée K562-mb15-41BBL irradiée à 100 Gy a induit une multiplication des cellules NK par 21 en moyenne sans induire la prolifération des cellules T. Lorsque la culture a été prolongée jusqu'à 21 jours, le nombre de cellules a été multiplié par 277 en moyenne (Fujisaki *et al.*, 2009). L'élimination complète des cellules nourricières leucémiques a été confirmée par cytométrie en flux à l'aide de la détection de l'expression de la GFP (Lapteva *et al.*, 2012). Comme les cellules NK expansées en présence de lignées EBV-LCL, les cellules NK cultivées avec des K562-mb15-41BBL ont augmenté leur expression de surface des récepteurs NKp30, NKp44, NKp46 et des récepteurs activateurs tels que 2B4, DNAM-1, et NKG2D. Elles ont présentées une cytotoxicité accrue envers les cibles K562 par rapport aux cellules NK stimulées fraîchement ou activées par IL-2.

Des chercheurs ont récemment rapporté que d'autre modification génétique des cellules K562 peuvent être utilisées pour renforcer encore leur potentiel d'expansion des cellules NK. Denman et Liu ont mis au point une lignée cellulaire K562 qui a été modifiée génétiquement pour exprimer CD64 (Fc γ RI), CD84 (B7-2), CD137L (4-1BBL), CD19 tronqué, et l'IL-21 liée à la membrane (mbIL-21) (Denman *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2013).

5. Cellules NK et essais cliniques

a) Cellules NK autologues avec IL-2

Les premiers essais d'immunothérapie ont évalué l'administration d'une faible dose d'IL-2 par jour pour développer les cellules NK après autogreffe de CSH chez des patients atteints de LNH et de cancer du sein. Par la suite, ils ont été réalisées basées sur l'administration de cellules NK autologues activées *ex vivo* avec l'IL-2 pendant 24h, puis injectées chez des patients et associées à l'administration sous-cutanée d'IL-2 (Burns *et al.*, 2003). Bien que l'analyse de ces études de phase II suggèrent une efficacité limitée des cellules NK autologues, elles ont néanmoins montré que: (1) l'IL-2 peut être administrée en toute sécurité jusqu'à trois fois par semaine (2) l'IL-2 peut induire une augmentation des lymphocytes cytotoxiques circulants avec une augmentation disproportionnée des cellules NK, et (3) il existe *in vivo* une compétition entre les lymphocytes du receveur et les cellules NK pour les cytokines. Par la suite, le rôle des récepteurs inhibiteurs KIR exprimés à la surface dans l'alloréactivité des cellules NK a été clairement identifié. Les cellules NK autologues étaient peu susceptibles d'exercer un effet anti-tumoral du fait des signaux inhibiteurs déclenchés par les molécules du CMH de classe I, ouvrant ainsi la voie à l'utilisation des cellules NK dans un contexte allogénique.

b) Transfert adoptif de cellules NK allogéniques

À ce jour, il existe peu d'essais cliniques qui ont décrit les méthodes pour isoler, activer et développer des cellules NK à des fins d'immunothérapie adoptive après greffe de CSH (voir le tableau 3 et 5 pour plus de détails) (Koehl *et al.*, 2004; Yoon *et al.*, 2010; Rizzieri *et al.*, 2010; Brehm *et al.*, 2010; Stern *et al.*, 2013). Les injections de cellules NK ont eu lieu dans différents contextes d'allogreffes, génoïdétiques, phénoïdétiques, haploïdétiques avec des

cellules NK provenant soit du donneur de CSH soit d'une tierce partie (Schaffer *et al.*, 2016). Rizzieri *et al* ont évalué la sécurité d'administration d'injections de lymphocytes du donneur enrichis en cellules NK par enrichissement CD56 seul. Les injections ont été réalisées chez des patients allogreffés avec greffons déplétés en cellules T prélevés chez des donneurs compatibles 3/6 à 6/6. La dose moyenne de cellules NK administrée a été de 10×10^6 /kg chez les patients ayant reçu une greffe compatible et de 9×10^6 /kg chez ceux ayant reçu une greffe partiellement incompatible. La tolérance des injections a été excellente dans les 2 contextes de greffe avec peu de GVH observée malgré la contamination du produit en lymphocytes T (Rizzieri *et al.*, 2010). Koehl *et al* ont montré la faisabilité de l'administration de cellules NK chez 3 patients après allogreffe haploidentique. Les cellules NK du donneur de CSH ont été isolées à l'aide d'une technique en 2 étapes et activées avec de l'IL-2. Cette étude a été suivie par un essai de phase I/II réalisé par la même équipe chez 16 enfants ayant reçu une allogreffe haploidentique. Les patients ont été repartis dans 2 groupes, l'un recevant 3 injections de cellules NK à J3, J40 et J100 de cellules NK non stimulées et l'autre recevant le même schéma d'injection mais avec des cellules NK stimulées par l'IL-2. Ils ont observé que l'administration des cellules NK stimulées modifiait transitoirement la repartition de différentes populations cellulaires dans le sang périphérique et s'accompagnaient du relargage de cytokines possiblement impliquées dans la recirculation des cellules NK. En 2013, Stern *et al* ont été publiées les données cliniques des patients inclus dans cette étude. Sur les 16 patients traités, 4/16 étaient toujours en vie après 6 ans. Les causes de décès observées ont été la rechute pour 5 patients, la GVH pour 3, la défaillance de greffe pour 3 et une neurotoxicité liée à la transplantation pour 1. Bien que les injections aient été relativement bien tolérées, la comparaison avec un groupe de patients «historiques» pris comme contrôles n'a cependant pas montré d'efficacité des cellules NK envers la défaillance de greffe et la rechute (Koehl *et*

al., 2004; Brehm *et al.*, 2011; Stern *et al.*, 2013).

Yoon *et al* ont quant à eux démontré la faisabilité de l'expansion de cellules NK à partir de progéniteurs CD34⁺ prélevées dans les suites d'aphérèse réalisées chez 14 patients dans le cadre d'une allogreffe partiellement incompatible. L'injection de cellules NK ($9,2 \times 10^6$ /kg) en moyenne a été globalement bien tolérée mais l'efficacité du traitement n'a pu être démontrée, la plupart des patients ayant subi une récurrence de la maladie après administration (Yoon *et al.*, 2010). Dans le même contexte de réinjection de cellules NK au décours d'une greffe haploidentique, Choi *et al* ont réalisé un essai d'escalade de doses dans l'objectif de déterminer la dose optimale à administrer. Les doses administrées s'échelonnaient entre 0,2 et $> 1 \times 10^8$ /kg et étaient répétées 2 fois, à 2 et 3 semaines de la greffe. Aucune différence n'a été observée en termes de prise de greffe, GVH, ou mortalité liée à la greffe en comparaison avec un groupe historique de contrôles. Par contre, une réduction significative de la progression leucémique a été observée dans le groupe traité (Choi *et al.*, 2014).

En 2016, Shaffer *et al* ont évalué si l'administration de cellules NK haploidentiques pouvait entraîner un effet GVL sans GVH chez des patients en rechute après allogreffe HLA compatible. Chaque patient (n = 8) a reçu une dose comprise entre 4 et 22×10^6 /kg après une chimiothérapie lymphodéplétante et l'administration conjointe d'IL-2 toutes les 48 heures pendant 12 jours après l'injection des cellules NK. Si les injections ont été bien tolérées, la persistance à long terme des cellules NK n'a pu être établie dans cette petite cohorte de patients.

Tableau 5. Résultats des études portant sur l'immunothérapie adoptive de cellules NK après greffe de CSH

Référence	Approche	Maladie	Source de cellules NK	Dose	Résultats
Koehl et	Infusion de cellules NK	2 LAL; 1 LAM	CSH de	Les cellules NK ont	Bien tolérées sans GVHD ou

al, 2004	activées par IL-2 à 1 ou 2 jours après greffe de CSH, suivie par l'administration supplémentaire tous les 4 à 6 semaines après greffe de CSH de HLA-dépareillés		donneur	été perfusées à une dose médiane de $16,15 \times 10^6$ cellules/kg	d'autres événements indésirables. Le patient atteint de LAM est mort de rechute à J80, tandis que les patients LAL sont tous morts de thrombotique purpura thrombocytopenique et de pneumonie virale atypique à J+45 et +152, respectivement.
Yoon et al, 2010	Infusion de cellules NK activées par IL-15/21 (générées à partir de cellules CD34 ⁺ de donneur) après greffe de CSH de HLA-incompatibles	Leucémies aiguës; MDS	CSH de donneur	Perfusion à une dose médiane de $9,28 \times 10^6$ cellules/kg	aucune toxicité n'a été rapportée; 4 sur 14 (28%) bien vivant
Rizzieri et al, 2010	8 semaines après une allogreffe HLA 3-6/6 compatible puis suivie de DLI enrichies en cellules NK du donneur.	Allogreffe NMA avec alemtuzumab en cellules T épuisé à base de fludarabine.	CSH de donneur	Le nombre médian de cellules NK CD56 ⁺ CD3 ⁻ infusé a été de $10,6 \times 10^6$ cellules/kg dans le cadre apparié et $9,21 \times 10^6$ cellules/kg dans le cadre dépareillés.	Un patient chacun dans le cadre appariés (n = 14) ou dépareillés (n = 16) a expérimenté GVHDA sévère avec peu d'autres toxicités de perfusion. Répondeurs à long terme avec plusieurs infusions enrichies en cellules NK et amélioration de la récupération phénotypique de cellules T avait amélioré la durée des réponses et la survie globale.
Brehm et al, 2011	Infusion de cellules NK fraîches et/ou activées par l'IL-2 <i>ex vivo</i> à 3, 40 et 100 jours après haplo-greffe de CSH	Leucémie à haut risque ou des tumeurs ont subi haplo-greffe de CSH	CSH de donneur	Le nombre médian de cellules NK fraîches et activées <i>ex vivo</i> par l'IL-2 infusé été $14,1 \times 10^6$ cellules/kg et $15,0 \times 10^6$ cellules/kg, respectivement.	Transfert de cellules NK activées s'est traduit par une augmentation significative des niveaux de diverses cytokines / chimiokines (i.e. IFN- γ , IL-6, MIP-1 β) dans le SP de patients. En revanche, les cellules NK fraîches ne provoquent pas les mêmes effets.
Stern et al, 2013	Perfusion des cellules NK sélectionnées positivement après	Leucémie à haut risque ou tumeurs solides	CSH de donneur	1-3 infusions de cellules NK sélectionnées	4 sur 16 (25%) bien vivant

allogreffe de CSH haploidentique	hautement malignes	positivement à une dose médiane de 1,21 × 10 ⁷ cellules/kg
-------------------------------------	-----------------------	---

CSH, cellules souches hématopoïétiques; DLI, injection de lymphocytes du donneur; GVHD, maladie du greffon contre l'hôte; GVHDA, maladie du greffon contre l'hôte aiguë; GVHDC, maladie du greffon contre l'hôte chronique; HLA, humain leucocyte antigen; IFN, interferon; IL, interleukine; LAL, leucémie aiguë lymphoblastique; LAM, leucémie aiguë myéloïde; MDS, syndrome myélodysplasique; MIP, protéine inflammatoire macrophage; NK, natural killer; NMA, nonmyeloablative; SP, sang périphérique.

Au total, les cinq études mentionnées ci-dessus ont démontré que la perfusion de cellules NK allogéniques après greffe de CSH, soit immédiatement après le prélèvement ou après l'activation *ex vivo* est sûre. Certaines réponses sont encourageantes, le véritable bénéfice clinique de cette procédure, cependant, reste à être établi définitivement.

Chapitre IV : Travaux réalisés

Hypothèse de travail & Objectifs du travail

1. Hypothèse de travail:

L'immunothérapie adoptive par l'administration de cellules NK est une option thérapeutique envisageable. Le pourcentage de cellules NK étant faible dans le sang périphérique, une étape d'expansion est nécessaire pour pouvoir disposer d'un nombre de cellules suffisant pour avoir une efficacité thérapeutique. Actuellement, peu d'études visent à administrer des cellules NK seules pour bénéficier de leur effet anti-leucémique. L'effet greffe *versus* leucémie observé dans les allogreffes repose uniquement à l'heure actuelle sur les lymphocytes T et les cellules NK administrées dans le greffon de cellules souches hématopoïétiques. Notre objectif était de vérifier que les cellules NK présentes dans un greffon de cellules souches mobilisé par du facteur de croissance présentent les mêmes capacités en terme d'amplification, le même phénotype membranaire et la même fonctionnalité que des cellules issues de sang total de témoins.

Nos objectif étaient de:

- i. Comparer une méthode d'expansion *ex vivo* des cellules NK CD56⁺CD16⁺ soit à l'aide d'IL-15 soit à l'aide d'IL-15 et de billes couplées à un anti-CD335 (NKp46) et anti-CD2.
- ii. Comparer les phénotypes et les fonctions des cellules NK isolées à partir de collections de cellules souches périphériques mobilisées par un facteur de croissance, le G-CSF issues soit des donneurs sains prélevés dans le cadre d'allogreffe soit de patients dans le cadre d'autogreffes, avec le phénotype et fonctions des cellules NK isolées à partir de sang périphérique donneurs sains.

Matériels & Méthodes

1. Origine des prélèvements

Après consentement éclairé, les cellules NK ont été isolées à partir de différents prélèvements. Les cellules NK de sujets sains ont été isolées à partir de poches de sang total d'environ 150 mL. Les cellules NK de donneurs sains ont été isolées à partir de 3 mL du greffon de cellules souches périphériques (CSP) mobilisées par des injections de G-CSF et destinées à être administrées au decours d'une allogreffe à un receveur apparenté ou non. Les cellules NK de patients ont été isolées à partir de 3 mL de CSPs mobilisées afin d'obtenir un recueil de cellules souches suffisant pour une autogreffe. Les recueils de cellules souches périphériques sont très riches en globules blancs, c'est pourquoi, seuls quelques millilitres sont nécessaires pour obtenir la quantité de cellules NK nécessaires pour la réalisation des expériences et ce prélèvement n'entraîne pas de perte de chance pour le patient.

2. Purification des cellules NK

Le sang total (QSP 45 mL) est déposé dans les tubes Leucosep contenant 16 ml de milieu de séparation des lymphocytes puis centrifugé à 1000 g pendant 10 min. Une partie du surnageant est éliminée à l'aide d'une pipette puis l'anneau des CMN (Cellules Mononucléées) est transféré dans un tube 50 mL préalablement identifié. Les cellules sont ensuite lavées 2 fois avec du PBS. Le culot est resuspendu dans 1 mL de tampon MACS (PBS, 2 mM EDTA, 0,5 % albumine) puis numéré sur cellule de Malassez après dilution en leucoplate.

Les cellules souches mobilisées issues de donneurs sains ou de patients sont deplaquettisées par centrifugation à 200 g pendant 20 min puis comptées. En effet, la méthode de

prélèvement des cellules souches périphériques permet de limiter les globules rouges dans le prélèvement et ne nécessite pas la réalisation d'un ficoll.

Les cellules sont ajustées à la concentration de 10^7 cellules/80 μ L et les billes magnétiques anti-CD3 et anti-CD19 sont ajoutées à la concentration de 10^7 cellules/20 μ L puis incubées au réfrigérateur pendant 15 min. Après incubation, les CMN sont lavées par centrifugation (300 g, 10 min, +4 °C) avec le tampon MACS puis reprises dans 500 μ L de tampon MACS.

Les cellules marquées sont ensuite déposées sur une colonne de type LD préalablement équilibrée (Miltenyi Biotec, Allemagne). Les cellules qui ont fixé les anticorps couplés aux microbilles ont été retenues dans le champ magnétique créé par l'aimant au niveau de la colonne. Les cellules non marquées n'ont pas été retenues par la colonne et se retrouvent dans la fraction négative. Le tube collecteur a été ensuite changé et la fraction positive a été récupérée en décrochant la colonne de son aimant et en rinçant 3 fois avec 1 mL de tampon MACS. Les culots cellulaires des deux fractions positive (cellules nourricières) et négative (cellules NK) ont été récupérés par centrifugation (300 g, 10 min) et numérés sur cellule de Malassez avec du bleu Trypan.

3. Analyse phénotypique par cytométrie en flux

L'efficacité de la méthode de purification a été contrôlée en quantifiant par cytométrie en flux le pourcentage de cellules NK après la méthode de déplétion immunomagnétique et après 7, 10 et 14 jours d'expansion. Cette technique a été réalisée au sein de l'Unité de Thérapie Cellulaire et Tissus sur un cytomètre de type Becton Dickinson FACScanto I. La quantification des cellules NK a été réalisée en utilisant des anticorps anti-CD16-Fluorescein isothiocyanales (FITC) (Miltenyi Biotec) et anti-CD56-Allophycocyanin (APC) (Miltenyi Biotec). La contamination en lymphocytes T $CD3^+$ et en lymphocytes B $CD19^+$ a été

également évaluée. L'expression de certains récepteurs des cellules NK a été analysée en ciblant la population CD16⁺/CD56⁺ et en utilisant un marquage de surface avec les anticorps suivants: anti-NKG2D-Phycoerythrin (PE), (Miltenyi Biotec), anti-KIR2DL1-PE (Miltenyi Biotec), anti-KIR2DL3-PE (Miltenyi Biotec), anti-KIR2DL5-PE (Miltenyi Biotec), anti-CD137-PE (Miltenyi Biotec). Plus de 10,000 cellules ont été analysées par le cytomètre Canto1 (BD Biosciences).

4. Amplification des cellules NK

Afin d'amplifier les cellules NK, deux méthodes d'amplification ont été testées.

Un échantillon des cellules de la fraction négative a été mis en culture pendant 14 jours dans du milieu X-VIVO-15, 2 mM Glutamax, 10% SVF complété avec 50 ng/mL d'IL-15 (Miltenyi Biotec, Allemagne) ou avec 50 ng/mL d'IL-15 + des billes couplées à anti-CD335 (NKp46) et anti-CD2 (Miltenyi Biotec, Allemagne) dans des flacons de culture à une concentration finale de 1×10^6 cellules/mL (37 °C, 5% CO₂). Des cellules de la fraction positive irradiées à 30 Gy (cellules nourricières) ont été ajoutées à J0 à un ratio de 100 : 1. Le milieu de culture contenant 50 ng/mL d'IL-15 a été renouvelé deux fois par semaine. La viabilité cellulaire a été déterminée par coloration au bleu de Trypan.

5. Essai de cytotoxicité

5.1 Entretien des cellules K562

Les cellules K562 ont été utilisées comme cellules cibles des cellules NK dans les tests de cytotoxicité. La lignée cellulaire K562 a été maintenue en culture en permanence dans l'étuve à 37 °C sous 5% CO₂. L'entretien s'est fait deux fois par semaine, le lundi et le vendredi avec du milieu PRMI1640 SVF 20%. Les cellules sont diluées au 1/10^e pour

entretenir la lignée en continu, ou au 1/5^e lorsqu'un test de cytotoxicité est envisagé.

5.2 Test de cytotoxicité

Les cellules cibles K562 (1×10^6 cellules/mL, 2-4 mL) ont été marquées avec du ligand fluorescence amélioré (5 μ L) pendant 20 min à 37 °C et lavées 5 fois avec le milieu de culture. Elles ont ensuite été réparties en plaques de 96 puits à fonds ronds à une concentration de 5×10^4 cellules/puits. Les cellules effectrices (cellules NK, après amplification) ont été ajoutées aux cellules cibles à des rapports décroissants de 100 : 1 à 1.5 : 1 en triplicate. Après 2h d'incubation (37 °C, 5 % CO₂), les plaques ont été centrifugées (200 g, 5 min) et 20 μ L du surnageant de chaque puits ont été prélevés et mélangés à une solution d'Europium (Eu). L'Eu et le TDA forment un chélate stable (Eu-TDA) présentant une fluorescence très élevée. La mesure du signal fluorescent réalisée par le VICTOR (Perkin Elmer) corrèle directement avec le nombre de cellules cibles lysées. Le pourcentage de lyse spécifique a été calculé selon la formule suivante:

$\% \text{ de la lyse spécifique} = (\text{relargage expérimental} - \text{relargage spontané}) / (\text{relargage total} - \text{relargage spontané}) \times 100.$

Le relargage expérimental correspond au nombre moyen de cpm (coups par min) en présence des cellules effectrices, le relargage spontané est la moyenne des cpm des cellules cibles en présence de milieu de culture seul, et le relargage total est la moyenne des cpm des cellules cibles en présence de 10 μ L de tampon de lyse.

6. Cytometric bead array (CBA)

Les surnageants pour les analyses de cytométrie en flux ont été prélevés tous les 7, 10 et 14 jours au cours de la culture cellulaire. Ils ont été récoltés et stockés à -20 °C jusqu'à ce que

l'analyse des cytokines soit réalisée. L'IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, TNF et IFN γ ont été détectés simultanément en utilisant le kit cytokine CBA Th1/Th2/Th17 humaine (BD Biosciences, San Diego, CA, USA), selon les instructions du fabricant. En bref, 50 μ L de chaque échantillon ont été ajoutés à 50 μ L de billes de capture mélangées à 50 μ L de réactif de détection Th1/Th2/Th17 PE. Les échantillons ont été mis en incubation à température ambiante pendant 3 heures dans l'obscurité. Après incubation, les échantillons ont été lavés une fois et remis en suspension dans 300 μ L de tampon de lavage avant l'acquisition.

Les données ont été analysées à l'aide du logiciel FCAP Array. Des courbes de standard ont été établies pour chaque cytokine en utilisant le standard de cytokines mixte fourni avec le kit. La concentration de chaque cytokines dans le surnageant des cellules a été déterminée par interpolation à partir de la courbe standard correspondante. La gamme de détection était 20-5000 pg/mL pour chaque cytokine mesurée par le CBA.

7. Analyses statistiques

L'analyse statistique a été réalisée en utilisant le test t apparié de Student. Pour les deux tests, les valeurs $p < 0,05$ sont considérées significatives.

Résultats

Partie 1: Comparaison de 2 méthodes d'expansion *ex vivo* des cellules NK CD56⁺ CD16⁺ soit à l'aide d'IL-15 soit à l'aide d'IL-15 et de billes couplées à un anti-CD335 (NKp46) et anti-CD2.

1. Amplification des cellules NK

1.1 Comparaison entre l'IL-15 et l'IL-15 plus des billes couplées à anti-CD335 (NKp46) et anti-CD2

Nous avons évalué l'impact de la culture en présence d'IL-15 (50 ng/mL) associée ou non à des billes sur la prolifération des cellules NK.

Pour les cellules NK provenant de l'échantillon de sang de témoins, le nombre de cellules commence à augmenter après 7 jours d'expansion et la prolifération maximale des cellules NK est observée à la fin de la durée de culture. Aucune différence significative n'a été observée entre les 2 conditions de culture ($14 \pm 10,25 \times 10^6$ cellules *versus* $14 \pm 0,78 \times 10^6$ cellules) (Figure 15A1).

Pour les cellules NK provenant des CSPs mobilisées de donneurs sains, le nombre de cellules a commencé à augmenter après 7 jours d'expansion, à la prolifération maximale des cellules NK a été observée à la fin de la durée de culture. Aucune différence significative n'a été trouvée en termes d'expansion entre les 2 conditions de culture ($18 \pm 17,13 \times 10^6$ cellules *versus* $18 \pm 17,29 \times 10^6$ cellules) (Figure 15A2).

Pour les cellules NK provenant des CSPs mobilisées de patients, la prolifération maximale des cellules NK cultivées avec IL-15 a été atteinte après 10 jours d'expansion et a atteint un plateau. Les cellules cultivées en présence d'IL-15 et de billes ont atteint le maximum

d'expansion dès 7 jours. Cependant, passé ce délai, un arrêt de prolifération a été observé (Figure 15A3).

Par conséquent, l'ajout de billes couplées à la culture n'a pas permis d'améliorer la prolifération des cellules NK cultivées avec IL-15.

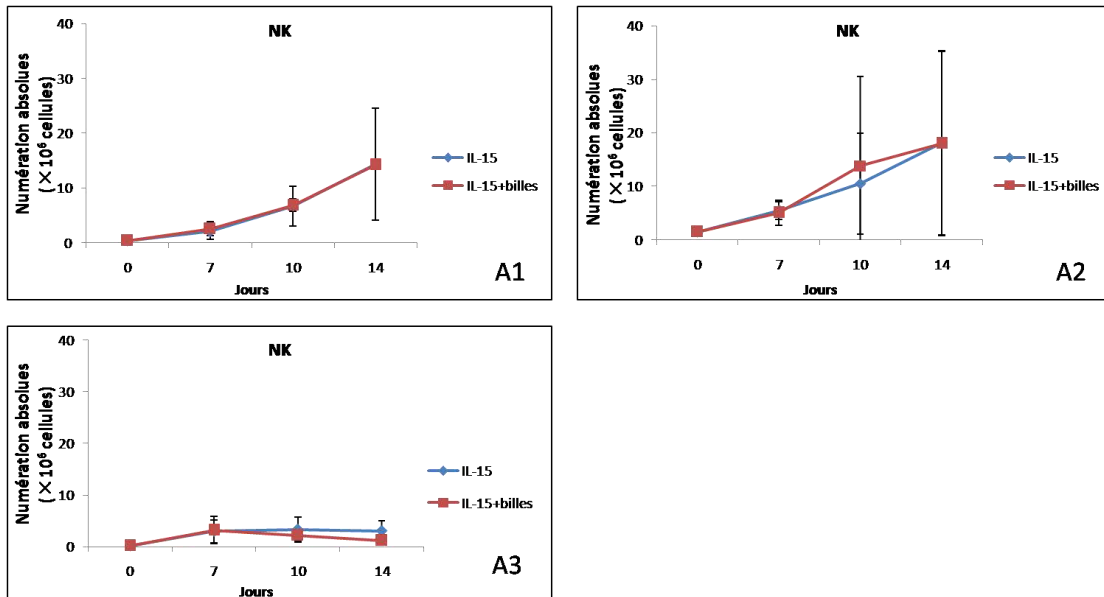


Figure 15. Amplification de cellules NK. Comparaison entre l'IL15 et l'IL15 plus des billes couplées à anti-CD335 et anti-CD2 pour les cellules NK issues de A1: sang de témoins, A2: CSP de donneurs sains, A3: CSP de patients (n = 3).

1.2 Comparaison de l'impact du statut physiologique entre le sang de témoins, les CSPs mobilisées de donneurs sains et de patients

1.2.1. Cellules NK cultivées en présence d'IL-15

Le nombre moyen de cellules NK de témoins obtenu en fin de culture en présence d'IL-15 a été de $14 \pm 10,25 \times 10^6$ cellules ce qui correspond à un ratio moyen d'expansion de $45 \pm 37,67$. La population obtenue a la fin de la culture était composée de $74 \pm 5 \%$ de cellules NK.

Le ratio d'expansion des cellules NK isolées à partir de CSP de donneurs sains et de patients

obtenu en fin de culture a été de $12 \pm 10,73$ et de $14 \pm 5,57$ respectivement (Figure 16A1). Concernant les résultats obtenus à partir de CSPs de donneurs sains, le nombre maximal de cellules a été obtenu à J14 ($18 \pm 17,13$). La population à la fin de la culture était composée de $63 \pm 10\%$ de cellules NK. Concernant l'expansion des cellules amplifiées à partir de CSP de patients, un plateau a été atteint à partir de J7. La population cellulaire obtenue à la fin de la culture était composée de $27 \pm 9\%$ de cellules NK.

Une différence significative en terme de pourcentage de cellules NK a été obtenue en fin de culture entre les cellules issues de sangs de témoins et de CSP de malades ($p = 0,013$) et entre les CSP de donneurs sains et de malades ($p = 0,041$).

1.2.2. Cellules NK cultivées en présence d'IL-15 et de billes

La prolifération maximale a été obtenue à partir de sang de donneurs sains avec un ratio moyen d'expansion de $40 \pm 13,92$ (Figure 16A2). Le ratio d'expansion obtenu à partir de cellules issues de CSPs de donneurs sains ou de patients a été respectivement de $12 \pm 10,82$, et de $7 \pm 3,11$. Cependant les différences observées entre les ratios d'expansion n'ont pas été trouvées significatives (témoins *versus* CSPs de donneurs sains: $p = 0,084$; témoins *versus* CSPs de patients: $p = 0,076$; CSPs de donneurs sains *versus* de patients: $p = 0,567$) La population obtenue après expansion représentait respectivement $76 \pm 11\%$, $59 \pm 9\%$ et $20 \pm 3\%$ de cellules NK $CD56^+CD16^+$ pour les échantillons issues de sang de témoins, de CSPs de donneurs sains et de patients. Une différence significative en terme de pourcentage de cellules NK a été obtenue entre les cellules issues de sangs de témoins et de CSP de malades ($p = 0,021$) et entre les CSP de donneurs sains et de malades ($p = 0,020$)

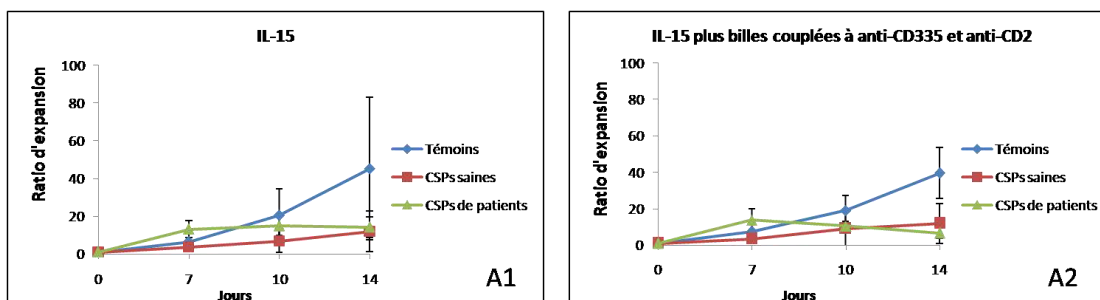


Figure 16. Ratio d'expansion des cellules NK. Comparaison d'impact du statut entre le sang de témoins, les CSPs mobilisées de donneurs sains et de patients en présence soit A1: d'IL-15 soit A2: d'IL-15 plus des billes à couplées à anti-CD335 et anti-CD2 (n = 3).

2. Phénotype membranaire

La caractérisation du phénotype des cellules NK a été réalisée dans le produit d'expansion final par rapport aux cellules NK dans le matériel de départ, afin de déterminer l'influence des billes couplées à anti-CD335 et anti-CD2 et des trois différentes origines des cellules NK sur l'expression des récepteurs. Pour chaque récepteur analysé, par exemple, NKG2D, KIR2DL1, KIR2DL3, KIR2DL5 et CD137, les valeurs moyennes d'intensité de fluorescence ont été prises en compte à partir du J0 au J14 d'expansion.

2.1 Comparaison entre l'IL-15 et l'IL-15 plus des billes couplées à anti-CD335 et anti-CD2

Pour les cellules NK issues de l'échantillon de sang de témoins, une augmentation d'expression de chaque récepteur a été observée mais sans différence significative entre les deux conditions de culture (Tableau 6a). Ainsi, pour NKG2D, l'expression du récepteur a atteint un pic après 10 jours d'expansion en présence d'IL-15 ou IL-15 et de billes (Figure 17A1). Pour KIR2DL1, l'expression du récepteur a atteint un pic à la fin de la durée de culture quelque soit les conditions de culture (Figure 17A2). Pour KIR2DL3 ou KIR2DL5,

l'expression du récepteur a atteint un plateau respectivement à 10 jours et à 14 jours d'expansion, en présence d'IL-15 ou IL-15 et de billes (Figure 17A3, 8A4). Pour CD137, l'expression du récepteur a atteint un plateau à partir de 7 jours, quelque soit la condition de culture (Figure 17A5).

Pour les cellules NK provenant des CSPs de donneurs sains cultivées avec IL-15 ou IL-15 plus des billes, une induction des récepteurs a été observée mais sans différence significative entre les deux conditions de culture (Tableau 6b). Ainsi, pour NKG2D, l'expression du récepteur a atteint un pic après 10 jours d'expansion en présence d'IL-15 plus des billes couplées à anti-CD335 et anti-CD2, et après 14 jours d'expansion en présence de IL-15 seul (Figure 17B1). Pour KIR2DL1, KIR2DL3, KIR2DL5 ou CD137, l'expression du récepteur a atteint un pic à J14 quelque soit les conditions de culture (Figure 17B2, 17B3, 17B4, 17B5).

Pour les cellules NK provenant des CSPs de patients, une augmentation significative de l'expression de KIR2DL3 a été observée entre J0 et J14 quelque soit la condition de culture ($p = 0,031$ et $p = 0,040$) (Figure 17C3; Tableau 6c). Pour NKG2D, l'expression du récepteur a atteint un pic après 7 jours d'expansion en présence d'IL-15 ou IL-15 et des billes (Figure 17C1). Pour KIR2DL1, l'expression du récepteur a atteint un plateau à partir de J7 jusqu'à la fin de la durée de culture, que les cellules soient cultivées ou non en présence de billes. (Figure 17C2). Pour KIR2DL5 ou CD137, l'expression du récepteur a atteint un plateau à J7 pour les 2 conditions de culture (Figure 17C4, 17C5).

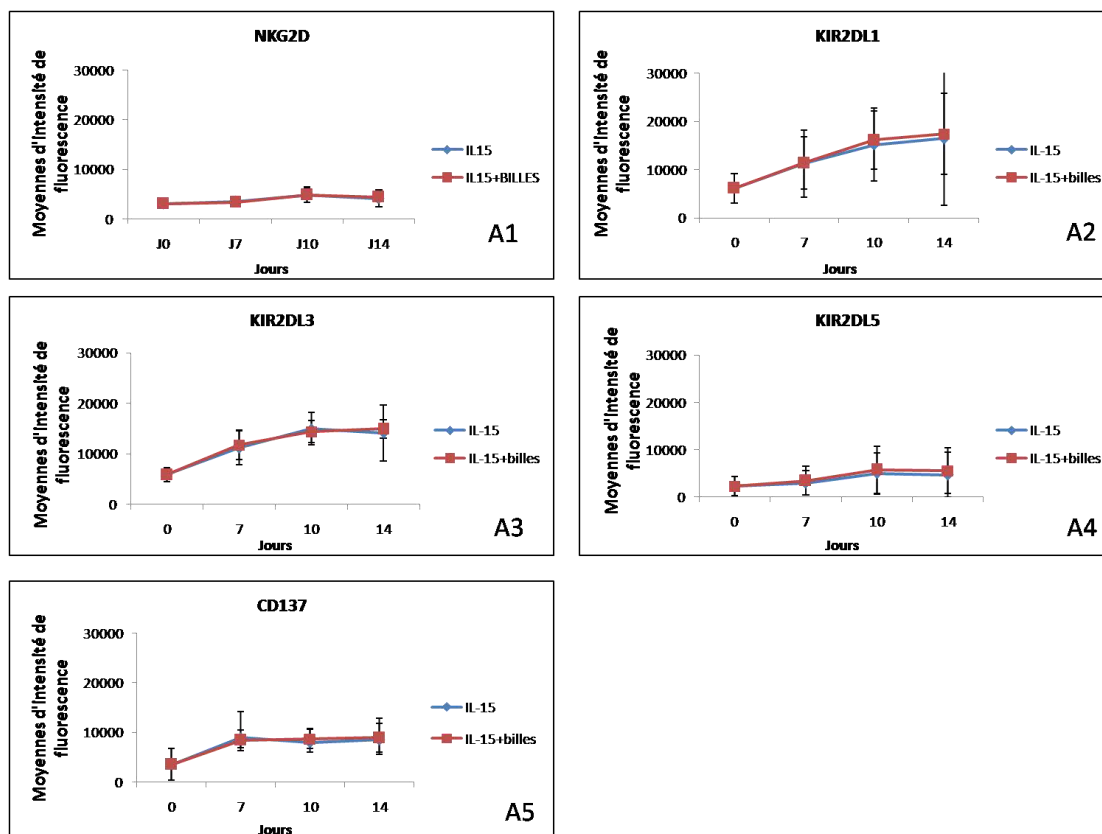


Figure 17A. Impact de la culture en présence d'IL15 et d'IL15 plus des billes couplées à anti-CD335 et anti-CD2 sur le phénotype membranaire des cellules NK issues de sang de témoins (n = 3). A1: profil d'expression de NKG2D, A2: profil d'expression de KIR2DL1, A3: profil d'expression de KIR2DL3, A4: profil d'expression de KIR2DL5, A5: profil d'expression de CD137.

Tableau 6a. Ratio d'expression des différents récepteurs entre J0 et J14 en fonction des 2 conditions de culture pour les cellules NK issues de sang de témoins (n = 3).

Marqueurs	IL-15		IL-15 et billes		IL-15 vs
	ratio J14/J0	p J14/J0	ratio J14/J0	p J14/J0	IL-15 et billes p
NKG2D	1,3	0,263	1,5	0,010*	0,674
KIR2DL1	2,5	0,252	2,9	0,074	0,525
KIR2DL3	2,4	0,106	2,6	0,010*	0,732
KIR2DL5	1,4	0,321	2,4	0,187	0,633
CD137	1,2	0,374	1,5	0,260	0,230

* : $p < 0,05$

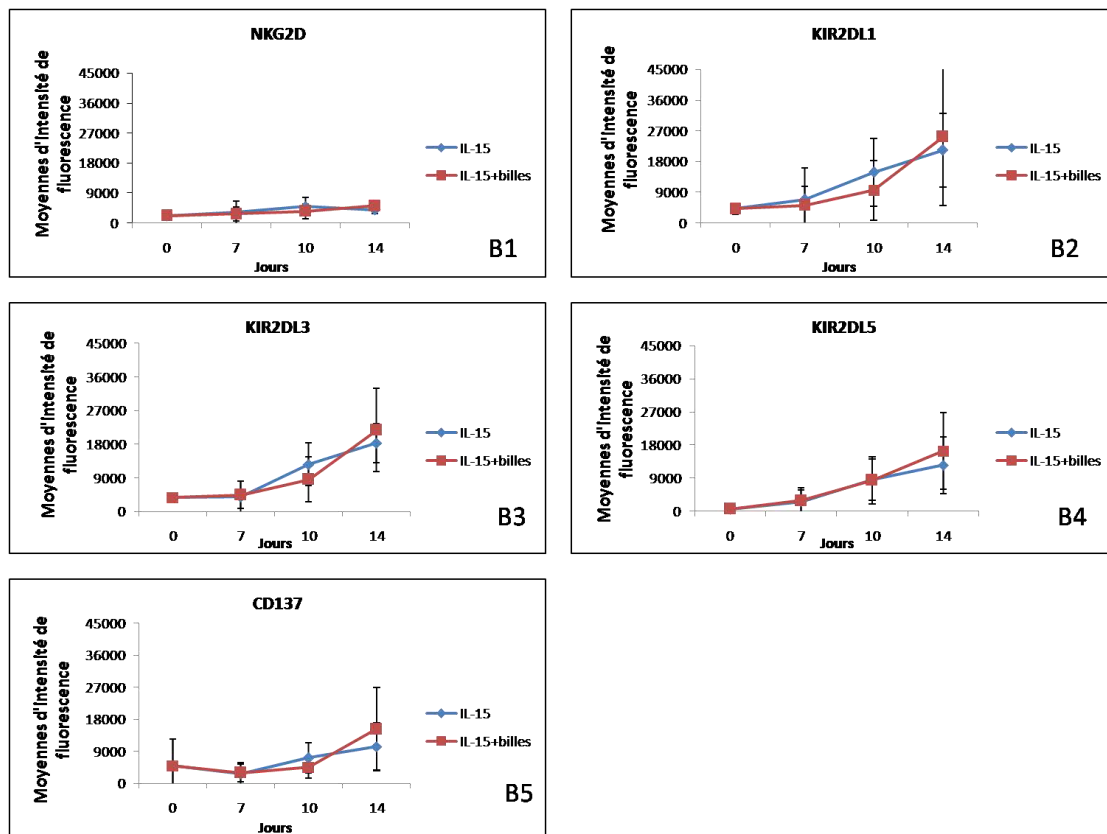


Figure 17B. Impact de la culture en présence d'IL15 et d'IL15 plus des billes couplées à anti-CD335 et anti-CD2 sur le phénotype membranaire des cellules NK issues de CSP de donneurs sains (n = 3). B1: profil d'expression de NKG2D; B2: profil d'expression de KIR2DL1; B3: profil d'expression de KIR2DL3; B4: profil d'expression de KIR2DL5; B5: profil d'expression de CD137.

Tableau 6b. Ratio d'expression des différents récepteurs entre J0 et J14 en fonction des 2 conditions de culture pour les cellules NK issues de CSP de donneurs sains (n = 3).

Marqueurs	IL-15		IL-15 et billes		IL-15 vs IL-15 et billes
	ratio J14/J0	<i>p</i> J14/J0	ratio J14/J0	<i>p</i> J14/J0	<i>p</i>
NKG2D	1,8	0,135	2,3	0,079	0,334
KIR2DL1	5,0	0,089	5,4	0,189	0,833
KIR2DL3	4,9	0,039*	5,6	0,100	0,631
KIR2DL5	10857,0	0,137	13601,6	0,133	0,731
CD137	2970,9	0,094	9366,3	0,374	0,423

* : $p < 0,05$

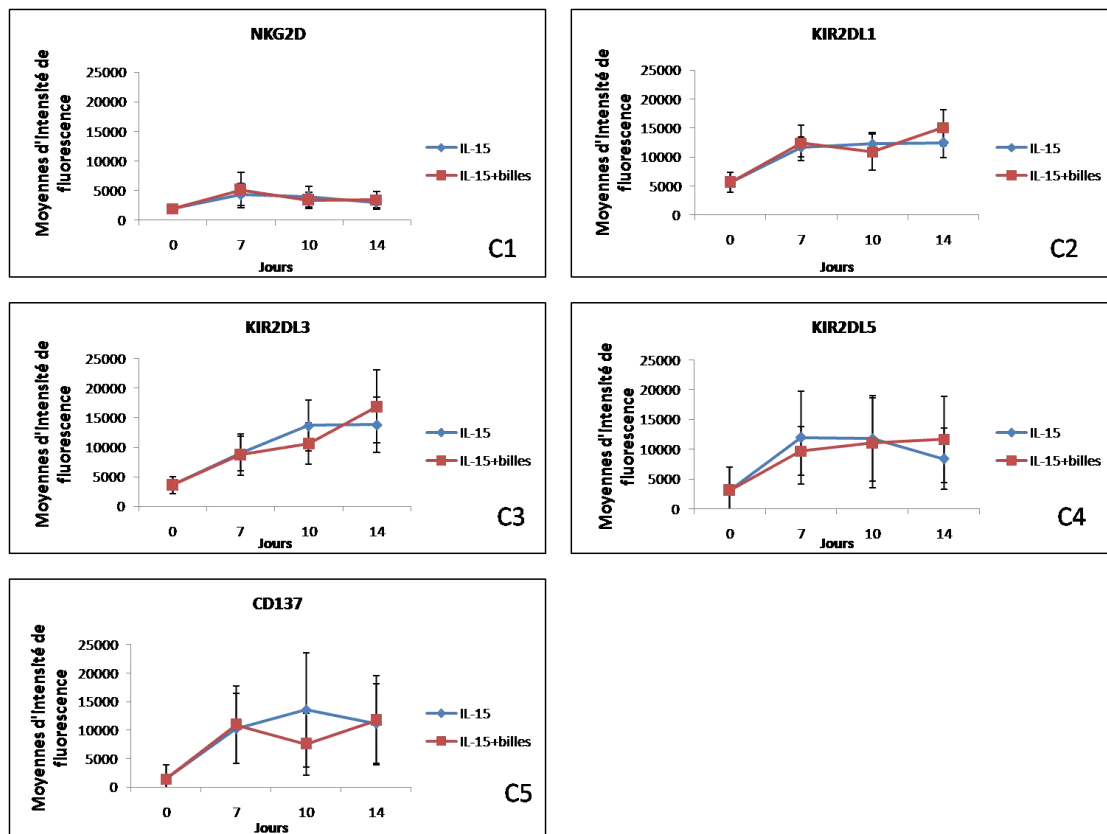


Figure 17C. Impact de la culture en présence d'IL15 et d'IL15 plus des billes couplées à anti-CD335 et anti-CD2 sur le phénotype membranaire des cellules NK issues de CSP de patients (n = 3). C1: profil d'expression de NKG2D; C2: profil d'expression de KIR2DL1; C3: profil d'expression de KIR2DL3; C4: profil d'expression de KIR2DL5; C5: profil d'expression de CD137.

Tableau 6c. Ratio d'expression des différents récepteurs entre J0 et J14 en fonction des 2 conditions de culture pour les cellules NK issues de CSP de patients (n = 3).

Marqueurs	IL-15		IL-15 et billes		IL-15 vs IL-15 et billes
	ratio J14/J0	<i>p</i> J14/J0	ratio J14/J0	<i>p</i> J14/J0	<i>p</i>
NKG2D	1,5	0,154	1,7	0,088	0,059
KIR2DL1	2,4	0,101	2,9	0,071	0,052
KIR2DL3	3,9	0,031*	4,7	0,040*	0,008**
KIR2DL5	973,7	0,057	1324,2	0,166	0,505
CD137	5370,3	0,085	5477,4	0,101	0,803

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$

2.2 Comparaison de l'impact du statut physiologique entre le sang de donneurs sains, les CSPs mobilisées de donneurs sains et de patients

2.2.1. Cellules NK cultivées en présence d'IL15

Les cellules NK cultivées en présence d'IL-15 ont montré une augmentation des cinq récepteurs (Figure 18A). Concernant NKG2D, une différence significative d'expression du récepteur a été observé à J0 entre les cellules de témoins et celles des patients ($p = 0,0013$). L'expression maximale de NKG2D a été observée à J7 sur les cellules des CSPs de patients et à J10 sur les cellules du sang de témoins ou des CSPs de donneurs sains (Figure 18A1). Pour KIR2DL1, l'expression du récepteur est la plus élevée à la fin de la durée de culture quelque soit l'origine des prélèvements (Figure 18A2). L'expression de KIR2DL3 a été significativement augmentée entre J0 et J14 sur les CSPs de donneurs sains ou de patients (Figure 18A3 et Tableau 6b et 6c). L'expression maximale de KIR2DL5 a été atteinte à J7 sur les CSPs de patients, à J10 sur des cellules de sang de témoins et à la fin de la culture sur les CSPs de donneurs sains (Figure 18A4). L'expression maximale de CD137 a été observée à J7, J10 et J14 sur les cellules de sang de témoins, de CSPs de patients et de CSPs de donneurs sains respectivement (Figure 18A5). L'origine des cellules NK n'a pas modifié significativement l'expression des différents récepteurs à l'issue de la culture.

2.2.2. Cellules NK cultivées en présence d'IL-15 et de billes

Les cellules NK cultivées en présence d'IL-15 et de billes ont montré une augmentation des cinq récepteurs (Figure 18B). Concernant NKG2D, une différence significative d'expression du récepteur a été observé à J0 entre les cellules de témoins et celles des patients ($p = 0,0013$). L'expression maximale de NKG2D a été atteinte après 7 jours d'expansion sur les CSPs de patients, après 10 jours sur des cellules du sang de témoins et après 14 jours sur des CSPs de donneurs sains. L'expression de NKG2D a été significativement diminuée entre les

CSP de donneurs et de patients à J14 (Figure 18B1; $p = 0,045$). Pour KIR2DL1 ou KIR2DL3, l'expression du récepteur a atteint un pic à J14 (Figure 18B2, 18B3). Une différence significative d'expression de KIR2DL1 a été observée à J7 entre les cellules de témoins et de donneurs sains de cellules souches périphériques ($p = 0,0005$). L'expression maximale de KIR2DL5 a été observée à la fin de la durée de culture sur les CSPs de donneurs sains ou de patients et après 10 jours d'expansion sur les cellules du sang de donneurs sains (Figure 18B4). Pour CD137, l'expression du récepteur est le plus élevée à la fin de la durée de culture (Figure 18B5). Une différence significative d'expression a été observée à J7 et à J10 entre les cellules de témoins et celles issues de CSPs de donneurs sains.

Pris dans leur ensemble, ces résultats montrent que les cinq récepteurs étudiés ont augmenté après 14 jours de culture avec de l'IL-15 ou IL-15 plus des billes couplées à anti-CD335 et anti-CD2 par rapport à l'expression basale des cinq récepteurs. L'origine des cellules NK a influencé significativement l'expression de certains récepteurs notamment NKG2D, KIR2DL1 et CD137.

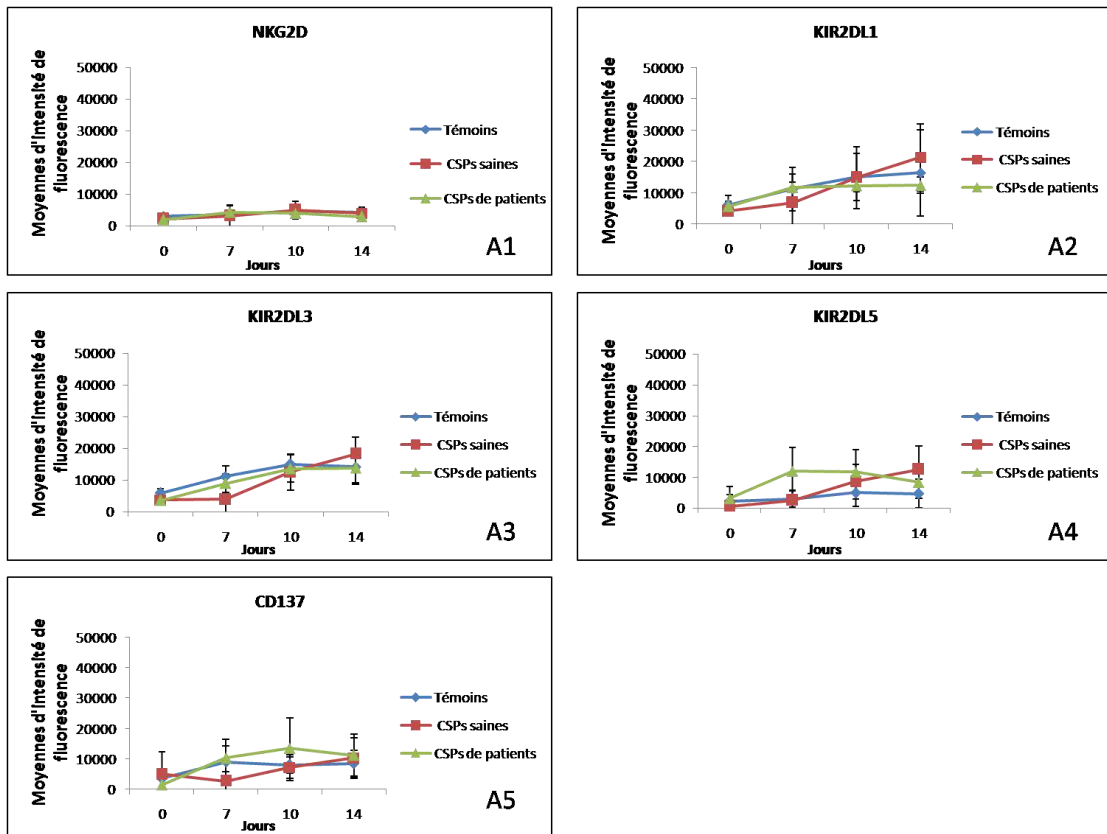


Figure 18A. Impact du statut entre le sang de témoins, les CSPs mobilisées de donneurs sains (CSPs saines) et de patients (CSPs de patients) sur l'expression des récepteurs des cellules NK cultivées en présence d'IL-15 (n = 3). A1: profil d'expression de NKG2D; A2: profil d'expression de KIR2DL1; A3: profil d'expression de KIR2DL3; A4: profil d'expression de KIR2DL5; A5: profil d'expression de CD137.

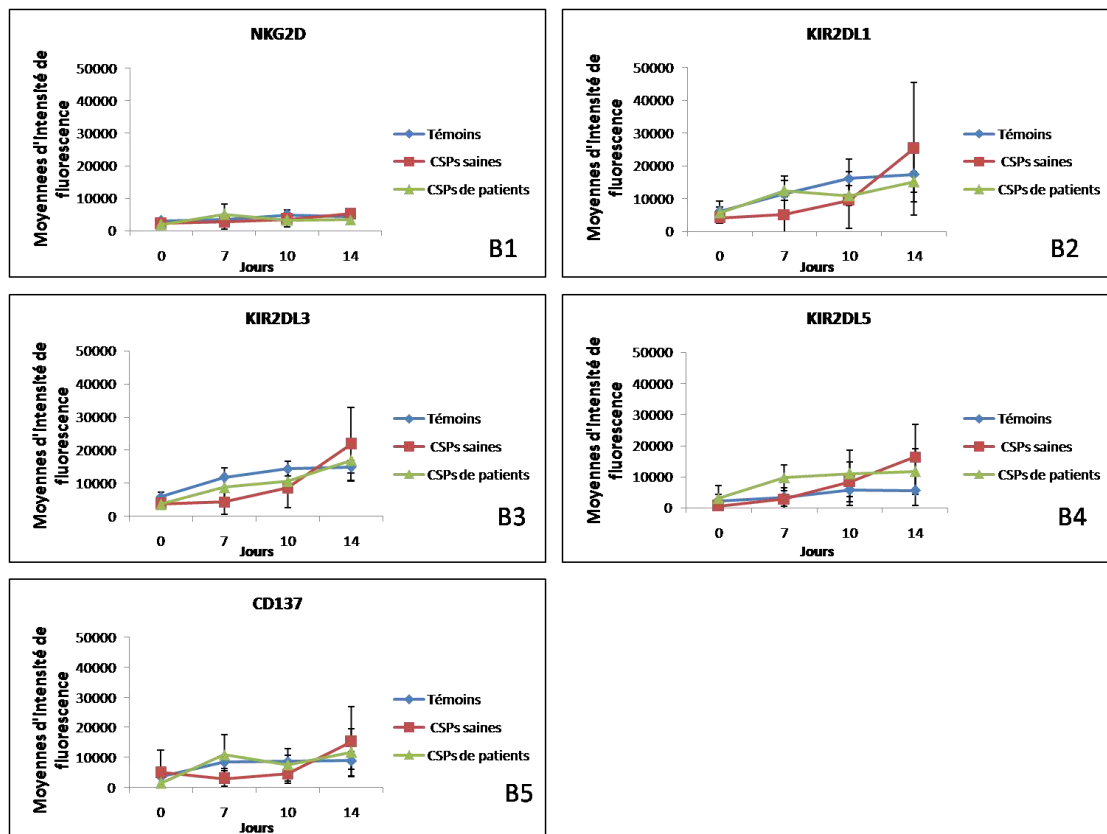


Figure 18B. Impact du statut entre le sang de témoins, les CSPs mobilisées de donneurs sains (CSPs saines) et de patients (CSPs de patients) sur l'expression des récepteurs des cellules NK cultivées en présence d'IL-15 et de billes (n = 3). B1: profil d'expression de NKG2D; B2: profil d'expression de KIR2DL1; B3: profil d'expression de KIR2DL3; B4: profil d'expression de KIR2DL5; B5: profil d'expression de CD137.

3. Cytotoxicité après amplification

3.1 Comparaison entre l'IL-15 et l'IL-15 plus des billes couplées à anti-CD335 et anti-CD2

Nous avons d'abord évalué la cytotoxicité des cellules NK envers les cellules K562 à la fin de la durée de culture avec de l'IL-15 ou IL-15 et de billes.

Pour les cellules NK issues de sang de témoins, le pourcentage le plus élevé de lyse était au rapport d'effecteur-cible de 12,5 : 1 sur les cellules cultivées en présence d'IL-15 ou IL-15 plus des billes couplées à anti-CD335 et anti-CD2 (Figure 19A), mais aucune différence

significative entre les deux conditions de culture n'a été observée.

Pour les cellules NK issues de CSPs de donneurs sains, le pourcentage le plus élevé de lyse était au rapport d'effecteur-cible de 50 : 1 sur les cellules cultivées en présence d'IL-15 et au rapport d'effecteur-cible de 6,25 : 1 sur des cellules cultivées en présence d'IL-15 plus des billes couplées à anti-CD335 et anti-CD2 (Figure 19B), mais aucune différence significative entre les deux conditions de culture n'a été observée.

Pour les cellules NK provenant des CSPs de patients, le pourcentage le plus élevé de lyse était au rapport d'effecteur-cible de 100 : 1 sur les cellules cultivées en présence d'IL-15 ou IL-15 plus des billes couplées à anti-CD335 et anti-CD2 (Figure 19C), mais aucune différence significative entre les deux conditions de culture n'a été observée.

3.2 Comparaison d'impact du statut entre le sang de témoins, les CSPs mobilisées de donneurs sains et de patients

Nous avons ensuite analysé l'impact de l'origine des cellules NK sur leur cytotoxicité.

3.2.1. Cellules NK cultivées en présence d'IL-15

En présence d'IL-15, le pourcentage le plus élevé de lyse était au rapport d'effecteur-cible de 12,5 : 1 pour les cellules issues de sang de témoins, 50 : 1 pour les cellules issues de CSPs de donneurs sains et au rapport d'effecteur-cible de 100 : 1 pour les cellules provenant des CSPs de patients (Figure 19D), mais il n'y a pas de différence significative entre les trois différents origines de cellules NK.

3.2.2. Cellules NK cultivées en présence d'IL-15 et de billes

En présence d'IL-15 plus des billes couplées à anti-CD335 et anti-CD2, le pourcentage le plus élevé de lyse était au rapport d'effecteur-cible de 12,5 : 1 sur des cellules issues de sang de témoins, 6,25 : 1 pour les cellules issues de CSPs de donneurs sains et au rapport d'effecteur-cible de 100 : 1 sur les cellules issues de CSPs de patients (Figure 19E), mais il

n'y a pas de différence significative entre les trois différents origines de cellules NK.

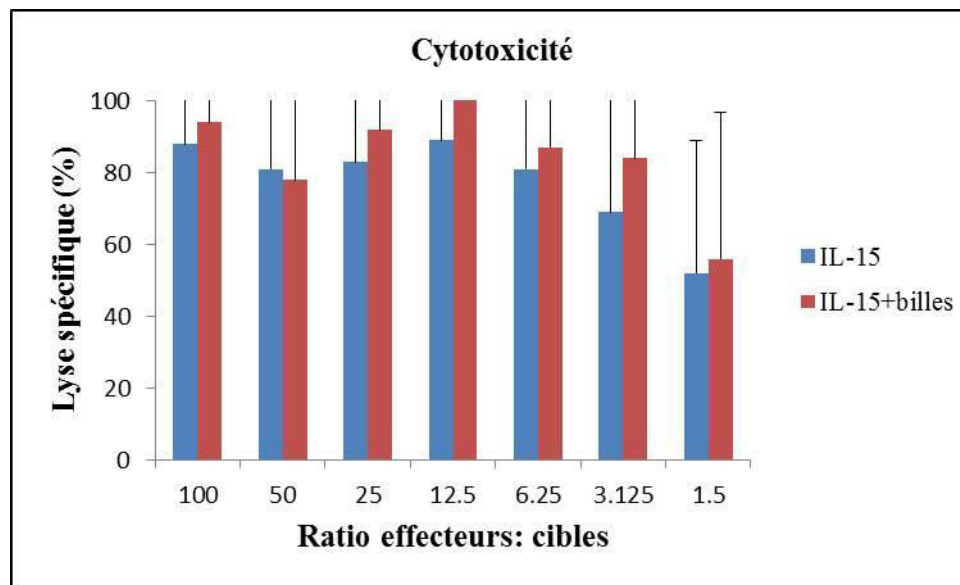


Figure 19A. Cytotoxicité après l'amplification. Comparaison entre l'IL15 et l'IL15 plus des billes couplées à anti-CD335 et anti-CD2 pour les cellules NK issues de sang de témoins (n = 3).

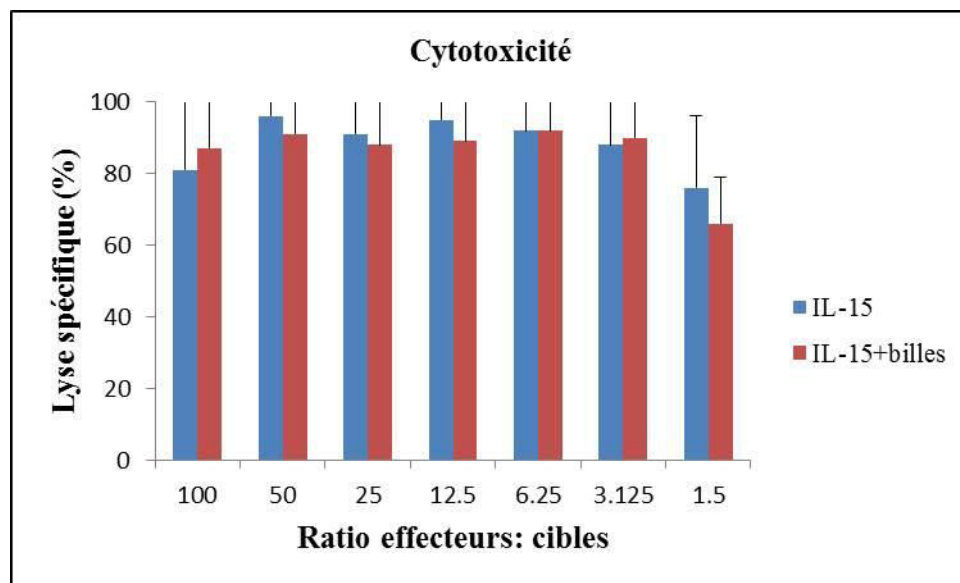


Figure 19B. Cytotoxicité après l'amplification. Comparaison entre l'IL15 et l'IL15 plus des billes couplées à anti-CD335 et anti-CD2 pour les cellules NK issues de CSP de donneurs sains (n = 3).

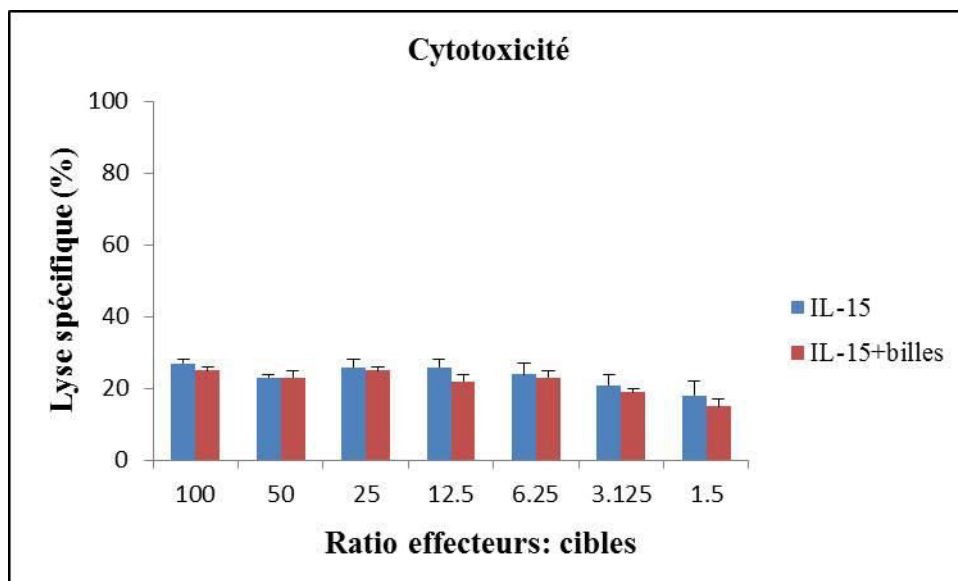


Figure 19C. Cytotoxicité après l'amplification. Comparaison entre l'IL15 et l'IL15 plus des billes couplées à anti-CD335 et anti-CD2 pour les cellules NK issues de CSP de patients (n = 3).

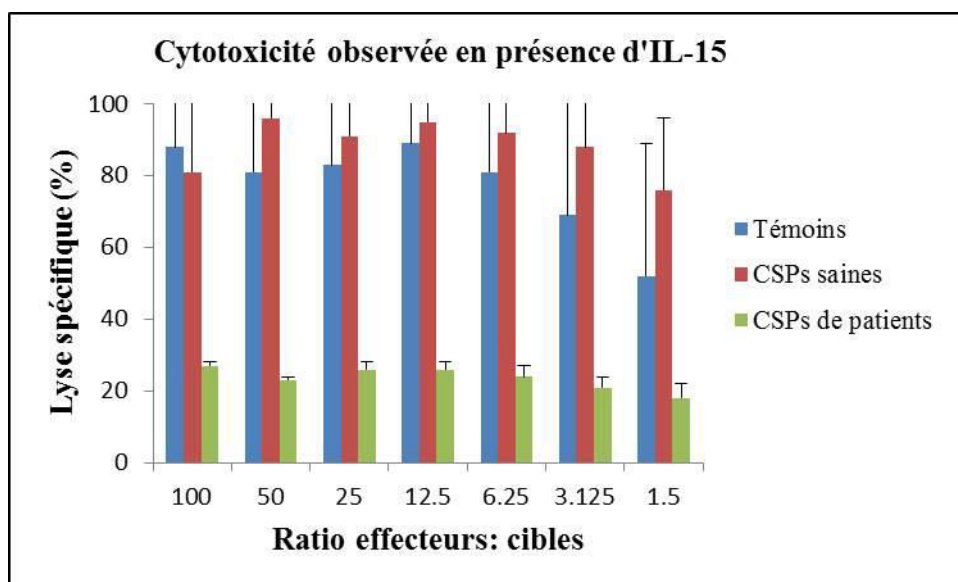


Figure 19D. Cytotoxicité après l'amplification. Comparaison d'impact du statut entre les témoins, les CSPs mobilisées de donneurs sains et de patients en présence d'IL-15 (n = 3).

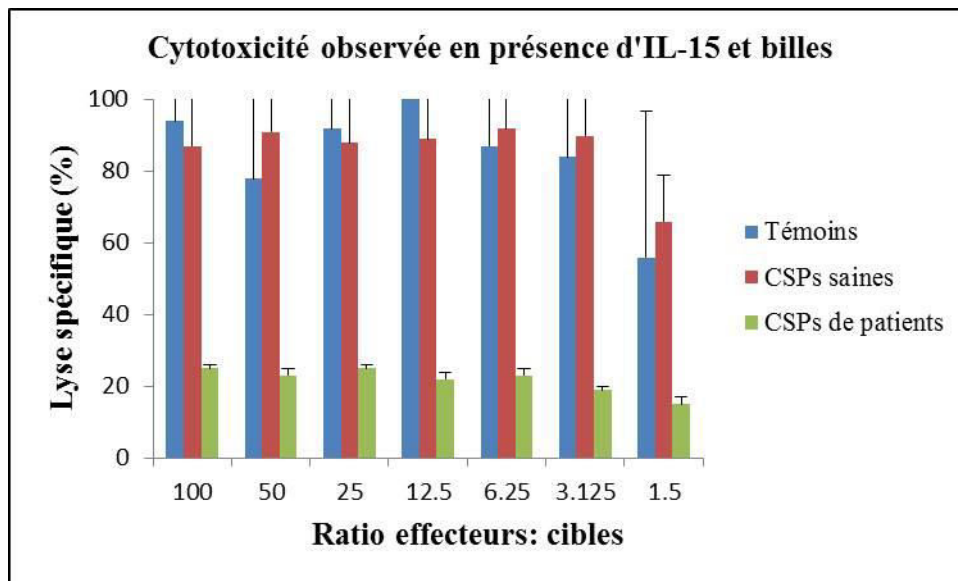


Figure 19E. Cytotoxicité après l'amplification. Comparaison d'impact du statut entre les témoins, les CSPs mobilisées de donneurs sains et de patients en présence d'IL-15 plus des billes couplées à anti-CD335 et anti-CD2 (n = 3).

Partie 2. Comparer les phénotypes et les fonctions des cellules NK isolées à partir de collections PBSC des donneurs sains et des patients mobilisés par granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF).

1. Cinétique de cellules CD56^{bright}CD16⁻ et CD56^{bright}CD16⁺ NK pendant la culture

Pour évaluer si le G-CSF peut influencer le phénotype de cellules NK lors de l'expansion de 14 jours en présence d'IL-15, une analyse par cytométrie en flux a été effectuée à différents temps sur les cellules NK isolées à partir du sang de donneurs sains (DS), CSP de DS ou CSP de patients. Une modification des sous-populations des cellules NK a été observée lors de l'expansion en fonction de la source des cellules NK. En ce qui concerne la sous-population cellule NK CD56^{dim}, le pourcentage le plus élevé de cette sous-population a été trouvé au jour 0 dans le sang périphérique de DS atteignant 25%. Un pourcentage moyen de 4% et 2% des cellules NK CD56^{dim} a été trouvée dans les CSP de DS et le CSP de patient, respectivement. Une diminution de cette sous-population a été observée tout au long de la durée de culture quelque soit la source des cellules NK. Cependant, une moyenne de 7% de CD56^{dim} a été retrouvée à J14 pour les cellules NK issues du sang de DS alors que cette sous-population disparaît presque à la fin de la période de culture pour des cellules NK isolées à partir de CSP de DS ou patient (Figure 20A).

En ce qui concerne la sous-population CD56^{bright}, une expansion de cette sous-population a été observée à la fin du temps de culture quelque soit la source des cellules NK, atteignant 83%, 91% et 92% des cellules NK issues du sang de DS, CSP de DS et CSP de patients, respectivement. On a ensuite concentré notre analyse sur l'expression de CD16 par cette sous-population étant donné que nous avons observé une différence dans la répartition CD56^{bright}CD16⁺ ou CD16⁻ entre chaque source de cellules NK. La caractérisation

phénotypique des cellules NK provenant du CSP de patient a révélé un développement significatif d'une sous-population des cellules NK CD56^{bright}CD16⁻ qui a atteint $64 \pm 7,4\%$ de la population totale des cellules NK à la fin de la culture. Ce phénomène a également été observé dans une moindre mesure dans les cellules NK à partir de CSP de DS et le sang de DS, mais atteint seulement $26 \pm 8,5\%$ et $15 \pm 5,5\%$ de la population totale des cellules NK, respectivement (Figure 20B). En ce qui concerne la population CD56^{bright}CD16⁺, une différence marquée a été observée entre le sang de DS et les sources mobilisées par G-CSF. Une diminution significative de l'expression CD16 a été observée entre les cellules NK de sang de DS et les NK de CSP de patient ($74 \pm 3,4\%$ *versus* $28 \pm 5,1\%$) et entre les cellules NK de CSP de DS et de CSP de patient ($64 \pm 5,5\%$ *versus* $28 \pm 5,1\%$) (Figure 20C).

Lorsque l'on regarde la cinétique d'expansion des cellules NK CD56^{bright}CD16⁻, elles ont été multipliées par 83,6 pour les cellules sanguines de DS, tandis que les cellules NK isolées de CSP de DS et les cellules NK isolées de CSP de patients ont été respectivement multipliées par 10,5 et 12,4 respectivement (Figure 20D). Les cellules NK CD56^{bright}CD16⁺ ont été quant à elles multipliées par 67,3, 12,3 et 9,6 pour les cellules sanguines de DS, les cellules NK isolées à partir de CSP de DS et de patients, respectivement (Figure 20E). L'expansion maximale des cellules NK a été observée à partir du sang de DS, cependant, la différence en terme d'expansion n'a pas été trouvée significative entre chaque source.

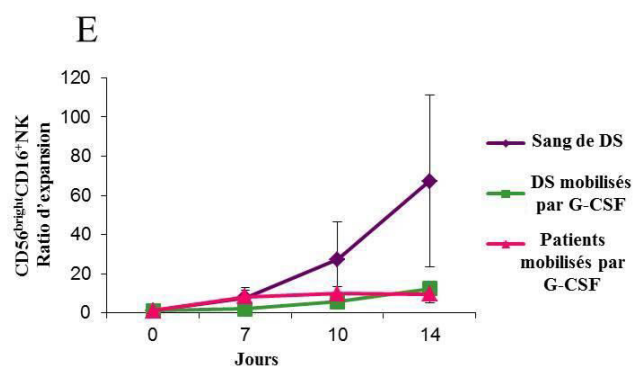
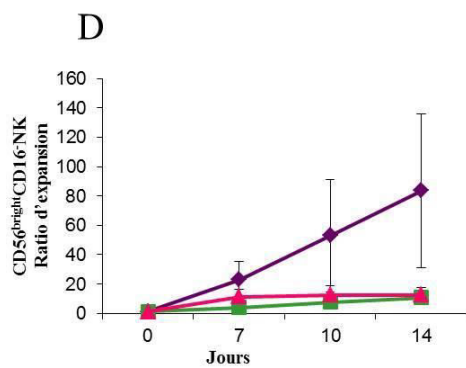
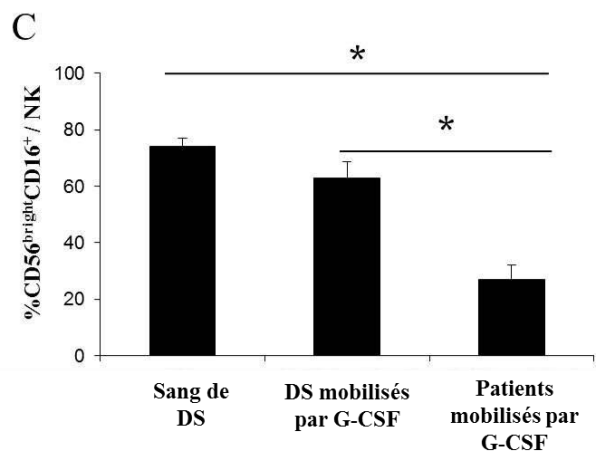
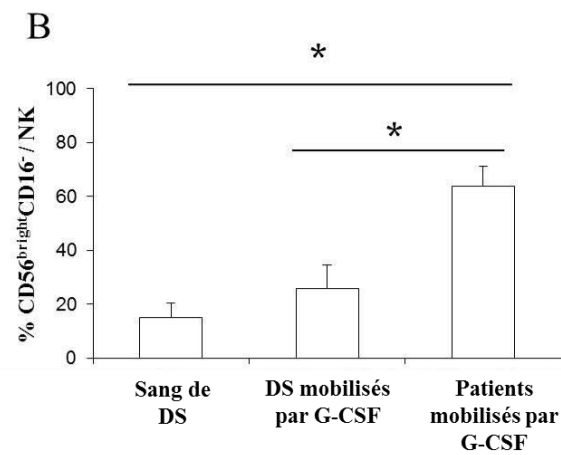
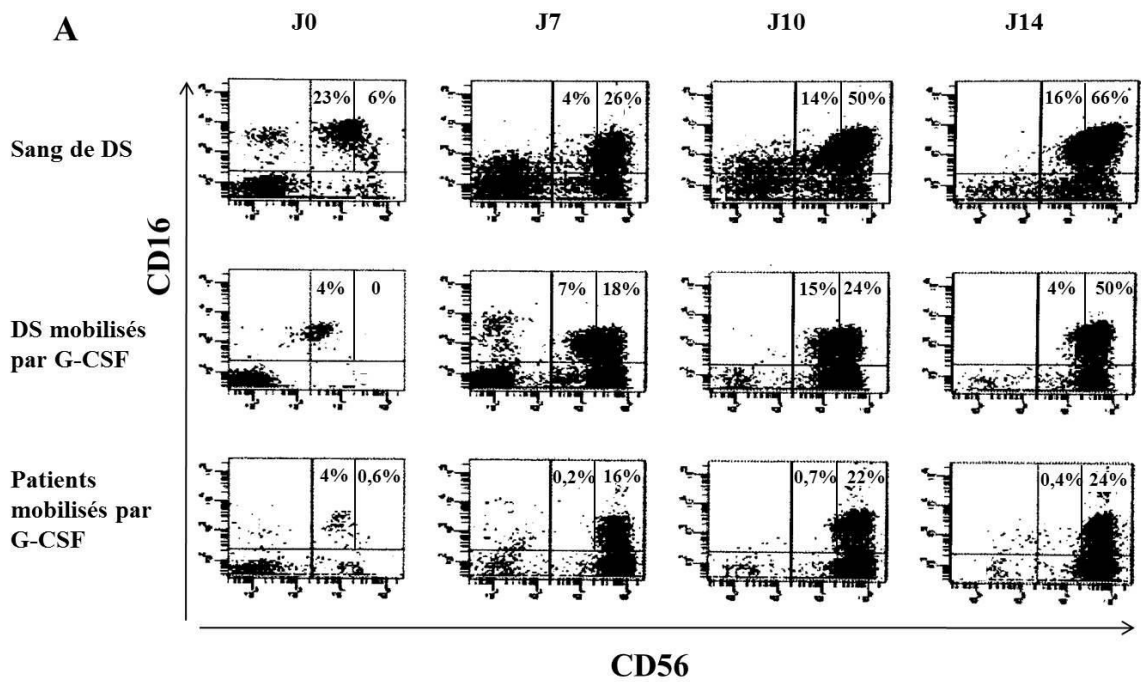


Figure 20. Analyse par cytométrie en flux des sous-populations en fonction de l'expression du CD56 et du CD16 selon l'origine des cellules NK au jour 0 (J0), 7 (J7), 10 (J10), et 14 (J14) de la culture (A). Pourcentages des CD56^{bright}CD16⁻ (B) ou CD56^{bright}CD16⁺ (C) après 14 jours de culture selon les sources. Dynamique d'expansion des cellules NK CD56^{bright}CD16⁻ (D) ou CD56^{bright}CD16⁺ (E) de différentes origines pour 14 jours de culture (n = 3). Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± SEM. Comparaison entre les groupes a été réalisée à l'aide de tests *t*. * P < 0,05.

2. Analyse de l'expression des récepteurs des cellules NK

Pour caractériser le phénotype des trois sources de cellules NK, une analyse détaillée de cytométrie de flux a été effectuée aux jours 0, 7, 10 et 14.

La figure 21A montre l'expression des récepteurs sur les cellules NK CD56^{bright}CD16⁻. En ce qui concerne les sources mobilisées par G-CSF, l'expression des 3 récepteurs KIR étudiés a augmenté entre le jour 0 et le jour 10, puis atteint un plateau entre le jour 10 et le jour 14. L'expression maximale des récepteurs KIR a été atteinte plus tôt à J7 pour les cellules NK de sang de DS. Une augmentation significative de l'expression de KIR2DL3 a été observée sur les cellules NK issues de CSP de patients comparativement à celle observée sur les cellules NK de CSP de DS à J7. L'expression maximale de NKG2D a été détectée au jour 0, jour 7 et le jour 10 sur les cellules sanguines de DS, CSP de patients et CSP de DS, respectivement. En ce qui concerne l'expression de CD137, elle a été clairement détectée au jour 7 pour les cellules sanguines de DS, mais n'a pas été modifiée sur les cellules NK isolées à partir de sources mobilisées par le G-CSF tout au long de la culture.

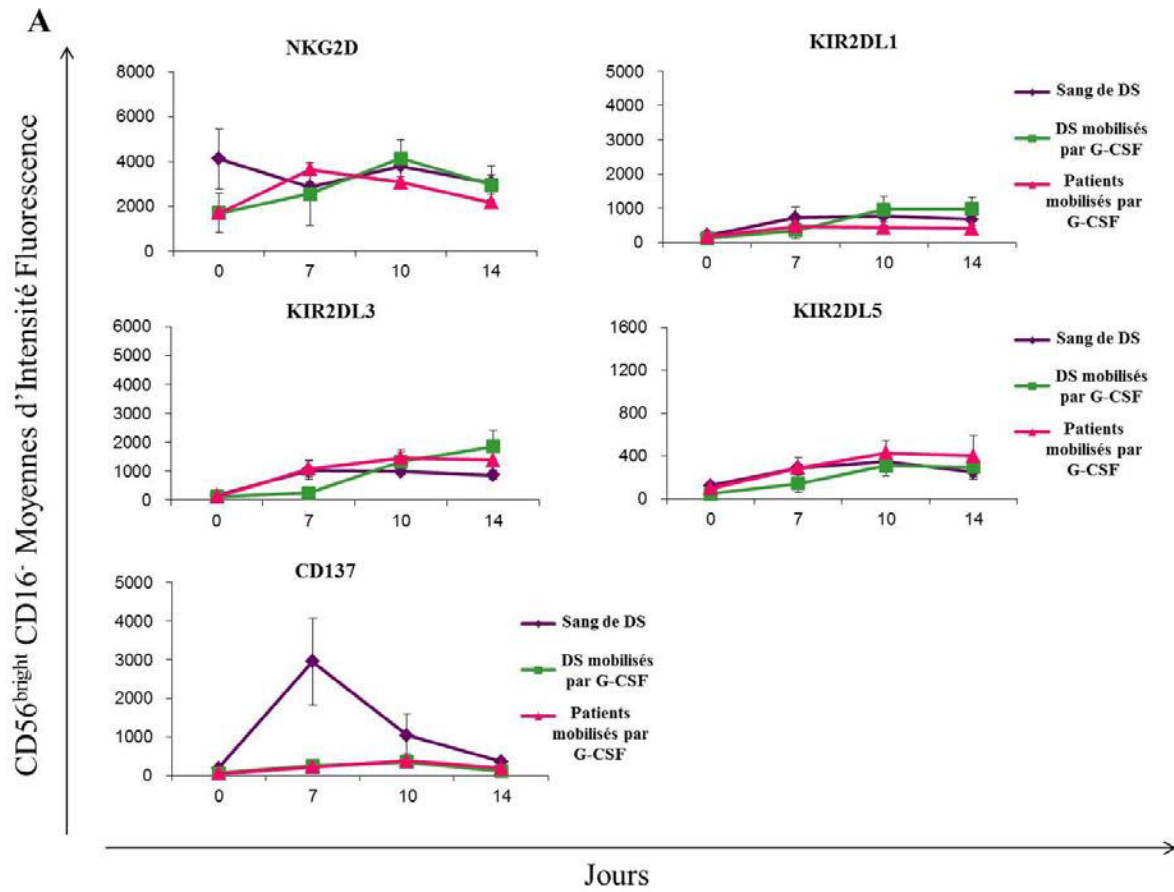
La figure 21B montre l'expression des récepteurs sur les cellules NK CD56^{bright}CD16⁺ selon les différentes sources. Fait intéressant, KIR2DL1 a été augmenté de façon significative sur les cellules NK de DS par rapport aux sources mobilisées par G-CSF à J0. Bien que l'expression de KIR2DL1 reste stable au long de la durée de culture sur des cellules de

patients ou de DS, une augmentation régulière de son expression a été observée sur les cellules de DS mobilisés. L'expression maximale de NKG2D sur les cellules NK $CD56^{bright}CD16^{+}$ a été observée au jour 10 sur les cellules sanguines de DS et les cellules issues CSP de DS, mais au jour 7 sur les cellules mobilisées de patient.

Les cellules de DS montrent un profil d'expression de KIR2DL3 similaire à KIR2DL1 au long de la culture. Cependant, son expression est significativement diminuée entre J0 et J7 sur les cellules NK de DS mobilisés par rapport aux DS. A partir de J7, son expression augmente sur les sources mobilisées par G-CSF.

Pour KIR2DL5, de manière similaire à KIR2DL3 et KIR2DL1, une expression stable de ce récepteur a été observée sur les cellules de DS entre le début et la fin de la culture. Son expression sur les cellules NK à partir de sources mobilisées par G-CSF reste au-dessous du niveau d'expression observé sur des cellules de DS, mais augmente régulièrement jusqu'au jour 14 où il atteint le niveau d'expression observé sur des cellules de DS. En ce qui concerne CD137, son expression était significativement plus élevée sur les cellules de DS au jour 0, jour 7 et le jour 10 que sur les sources mobilisées par G-CSF. Par contraste avec les récepteurs KIR, une augmentation très faible de son expression a été détectée au long de la durée de la culture.

Pris ensemble, ces résultats ont montré que les récepteurs KIR étudiés ont été augmentés après 14 jours de culture par rapport à leur expression basale sur les cellules NK $CD56^{bright}CD16^{-}$ quelle que soit la source cellulaire. Néanmoins, leur profil d'expression est différente sur cellules $CD56^{bright}CD16^{+}$ en fonction de la source des cellules NK. Leur expression reste stable sur les cellules de DS mais augmente sur les sources mobilisées par G-CSF.



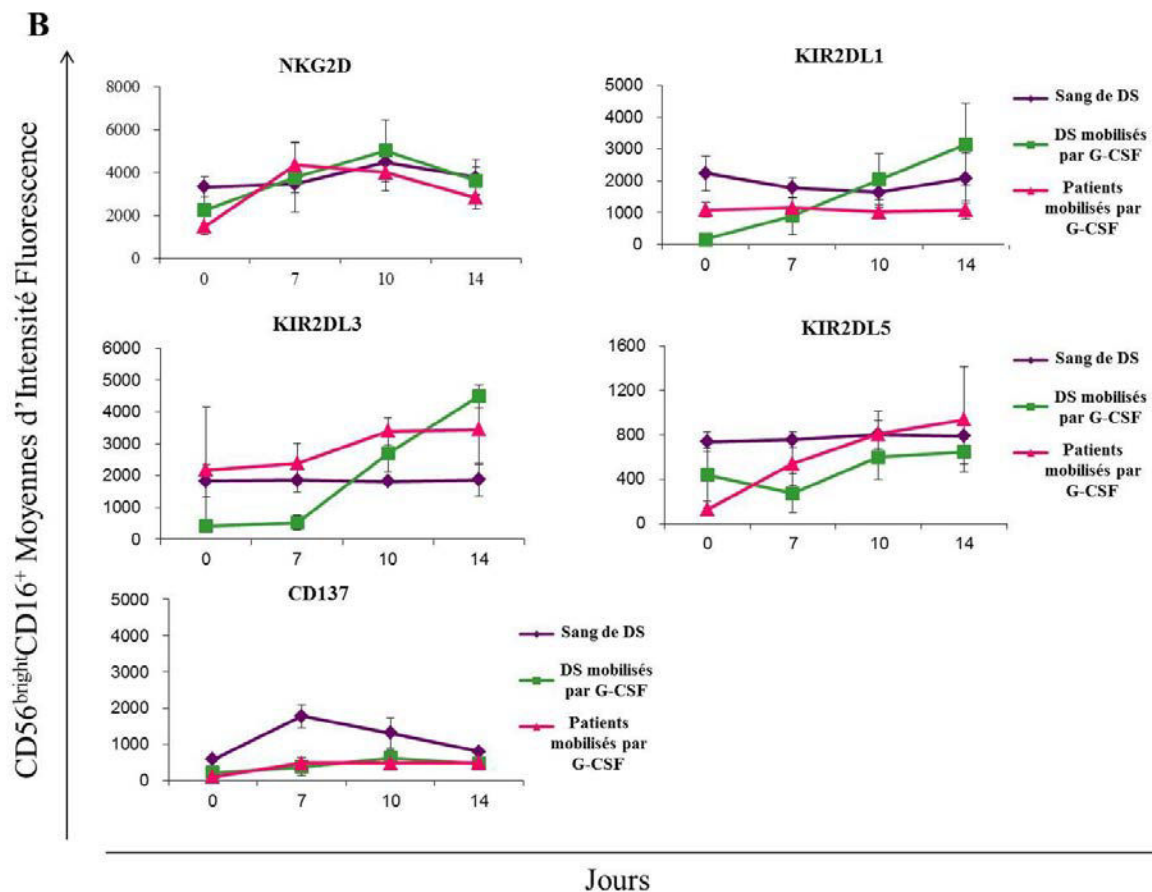


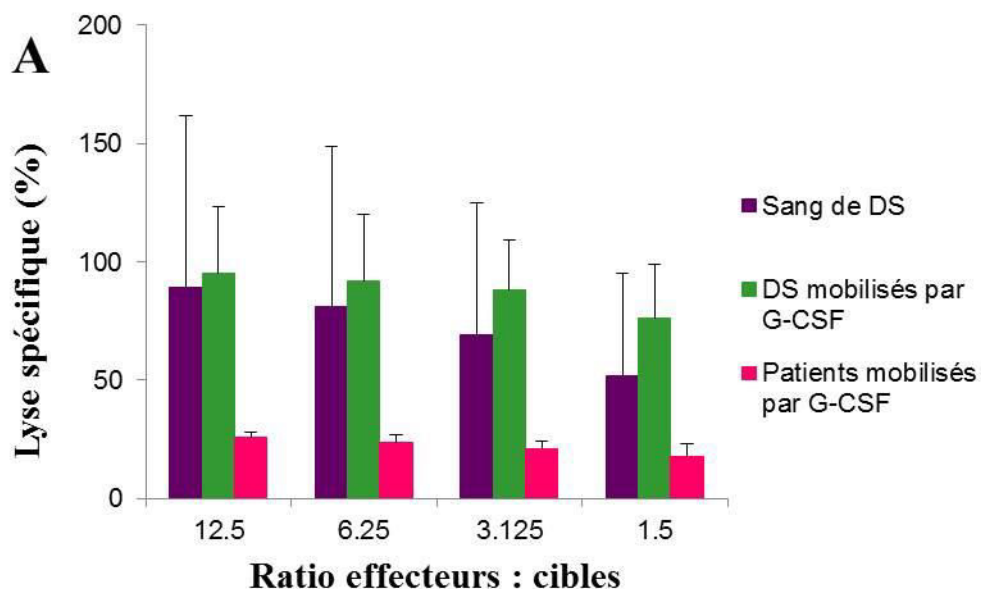
Figure 21. Changements dans les profils d'expression des récepteurs NKG2D, KIR2DL1, KIR2DL3, KIR2DL5 et CD137 sur les cellules NK CD56^{bright}CD16⁻ (A) ou CD56^{bright}CD16⁺ (B) pendant 14 jours de culture.

3. Cytotoxicité de cellules NK

Nous avons ensuite testé la cytotoxicité des cellules NK issues des 3 sources envers la lignée cellulaire K562 après 14 jours de culture à 3 rapports différents. Une cytotoxicité élevée a été observée envers les cellules K562 en ce qui concerne les cellules NK provenant de DS, mobilisés ou non. Les cellules NK de patients présentaient une diminution de la capacité de tuer des cibles tumorales, même après 14 jours de culture en présence d'IL-15 (Figure 22A).

4. Production de cytokines

En plus de leur capacité cytotoxique, les cellules NK sont capables de produire une variété de facteurs solubles. Afin d'évaluer l'impact de la mobilisation du G-CSF sur la fonctionnalité des cellules NK, nous avons effectué une analyse des cytokines présentes dans les surnageants de culture cellulaire au jour 7, 10 et 14. La production de TNF et d'IFN γ a été détectée dès J0 pour les cellules NK de DS, ce qui a été rapporté précédemment (Berg *et al.*, 2009), bien qu'une diminution de la production de cytokines se soit produite entre J7 et J14. Le taux de TNF et d'IFN γ sécrété par les cellules NK de CSP de DS et de patients a augmenté significativement entre J7 et J14 (Figure 22B). L'IL-6, l'IL-10 et l'IL-17A ont été principalement détectées dans les surnageants de culture de cellules NK de DS pour atteindre des valeurs supérieures aux niveaux de sensibilité (20 pg/mL) à J7 mais ne sont plus détectées à J14. Elles n'ont pas été détectées dans les surnageants de cellules NK issues de sources mobilisées.



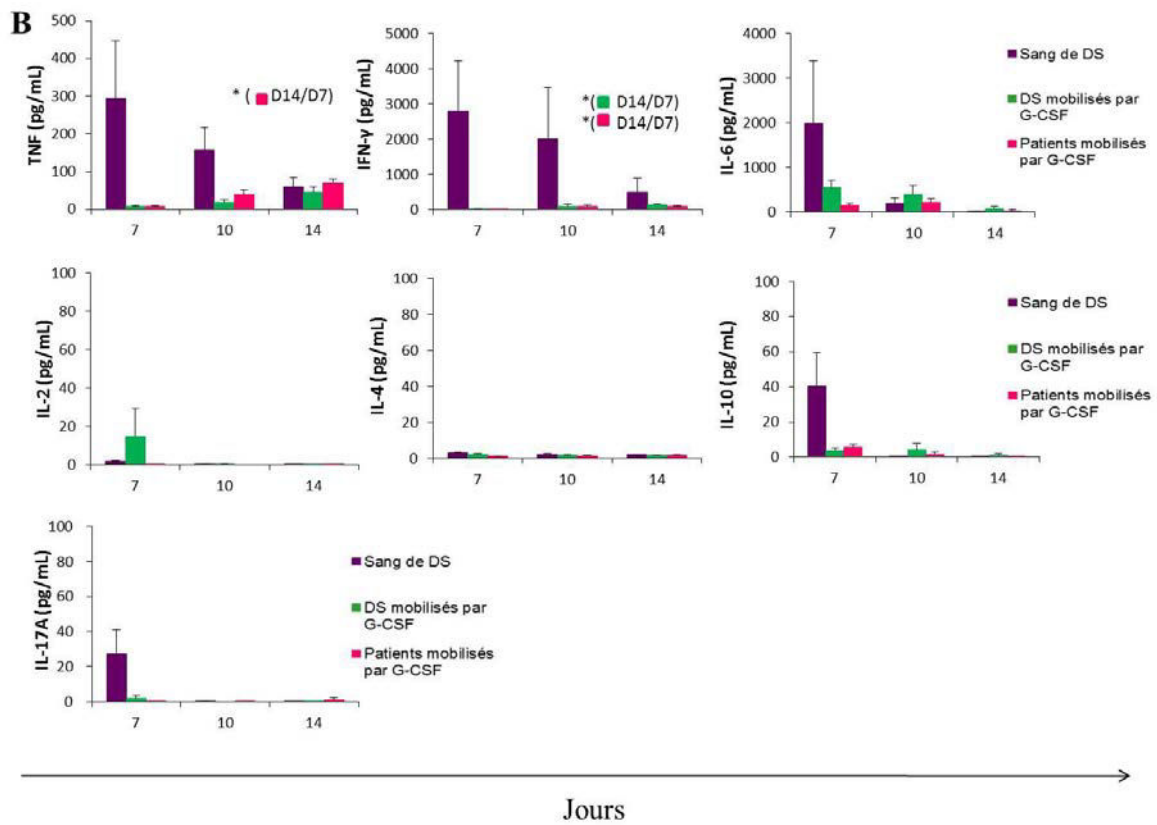


Figure 22. (A) Pourcentage de cytotoxicité de cellules NK de différentes origines envers les cellules K562, après 14 jours de culture. (B) Profil de sécrétion des cytokines des cellules NK d'origines différentes au jour 7, 10 et 14 au cours de la culture cellulaire. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM. La comparaison entre les groupes a été réalisée à l'aide de tests t . * $p < 0,05$.

Chapitre V : Discussion & Conclusion

En règle générale, les études de phase précoce avec des agents expérimentaux ne peuvent être justifiées que dans le contexte où il n'y a pas d'autres meilleures options de traitement standard. En conséquence, l'immunothérapie pour la leucémie aiguë a été explorée d'abord dans des cas paramètres désespérés de rechute après post-greffe. Cependant, ce ne sont pas les meilleures situations cliniques dans lesquelles l'immunothérapie peut exercer son effet thérapeutique et la prochaine étape sera de définir le meilleur moment pour proposer une immunothérapie. La chronologie de l'intervention avec l'immunothérapie dans la leucémie aiguë est divisée en quatre périodes: la prévention; induction de rémission; consolidation (maintien de la rémission), y compris l'option de la greffe de CSH; et la gestion des cas réfractaires ou en rechute. Le schéma d'un exemple de la façon dont l'immunothérapie peut être incorporée au déroulement d'un traitement est représenté sur la Figure 23 (Ishii et Barrett, 2016).

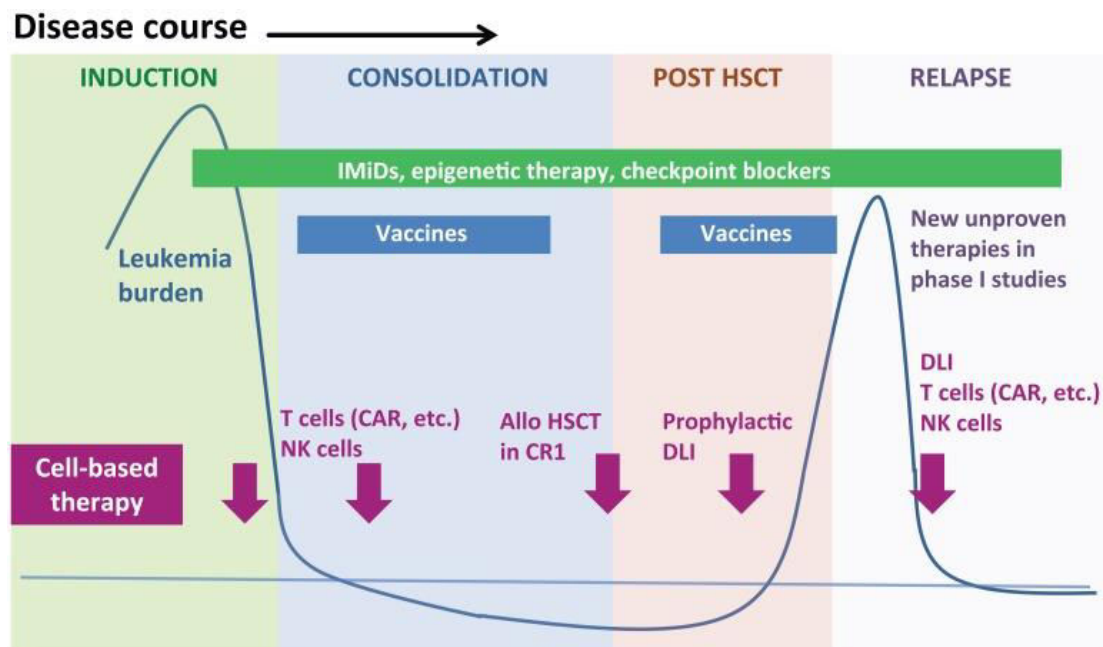


Figure 23. Moment de l'immunothérapie dans le cadre de la progression de la leucémie. Il est important de déterminer le moment le plus efficace pour chaque stratégie immunothérapeutique. L'environnement

immunitaire n'est pas statique, et est activement modifié par l'état de la leucémie et de l'hôte, et notamment de manière spectaculaire dans le contexte de la greffe de CSH. Ainsi, le même traitement peut ne pas avoir le même effet en fonction de l'environnement dans lequel il a été administré. De nouvelles thérapies ont été fréquemment testées d'abord dans la maladie récidivante ou réfractaire dans les études de phase I. Ces études fournissent des indications concernant le moment de l'administration et possibilité de combiner de multiples modalités thérapeutiques pour obtenir un meilleur effet. (CAR, récepteur de l'antigène chimère; CR1, la première rémission complète; DLI, injection de lymphocytes du donneur; HSCT, greffe de cellules souches hématopoïétique; IMiD, immunomodulateurs; NK, natural killer) (Ishii et Barrett, 2016).

L'immunothérapie adoptive pour le cancer a progressé de manière significative au cours des dernières années. Les cellules immunitaires ont le potentiel de court-circuiter des mécanismes cellulaires de résistance aux médicaments exercée par les cellules cancéreuses ou l'environnement tumoral tout en épargnant les tissus normaux (Romagne et Vivier, 2011; Baier *et al.*, 2013). Même si l'émergence de plus en plus de mécanismes de résistance immunitaire exercés par le microenvironnement tumoral doit être pris en compte. On ne sait pas dans quelle mesure l'échappement des cellules cancéreuses aux cellules immunitaires pendant la carcinogenèse ou après immunothérapie adoptive, est susceptible de rendre inefficaces les thérapies à base de cellules NK, ce qui entraîne la résistance et la rechute (Guillerey et Smyth, 2015).

L'un des principaux défis pour l'immunothérapie cellulaire est son coût. Produire des cellules dans un environnement conforme aux bonnes pratiques de fabrication est très cher, en particulier lorsque plusieurs étapes sont utilisées pour la purification et qu'une stimulation par des cytokines sont nécessaires. Dans l'immunothérapie basée sur les cellules NK, l'absence d'une méthode d'expansion de référence à grande échelle de grade clinique permettant d'obtenir des produits reproductibles est un obstacle majeur à surmonter, et dépend du nombre de cellules NK initiales, du phénotype, du génotype et de la fonctionnalité des cellules NK qui varient selon les donneurs. Dans les essais cliniques, la production des

cellules NK doit être suffisante pour atteindre une dose optimale. Les futurs essais doivent établir la dose maximale tolérée de cellules NK et les schémas posologiques associés, démontrer la présence ou l'absence de réponses dose-dépendantes, et de déterminer le nombre maximum de cellules T résiduelles qui peuvent être infusées en toute sécurité dans des contextes HLA-compatibles ou incompatibles. La réalisation de ces objectifs permettra de déterminer si un rendement élevé ou une haute pureté est plus importante dans l'expansion *ex vivo* des cellules NK. Plusieurs questions se posent encore: quel donneur utiliser comme source des cellules NK? Le même donneur que celui du don de CSH ou un donneur haploidentique? Si les cellules NK haploidentiques ont démontré leur efficacité *ex vivo*, leur efficacité *in vivo* reste transitoire en dehors du contexte d'une greffe haploidentique et il semble clairement nécessaire de réaliser une lymphodéplétion préalablement à leur administration pour leur permettre de persister suffisamment longtemps pour exercer un effet thérapeutique. Est-il nécessaire de les activer ou de les cultiver? L'activation semble clairement montrer tout du moins *ex vivo* un bénéfice en termes d'accroissement de la cytotoxicité, cependant l'administration *in vivo* de cytokines conjointement à leur administration semble faciliter leur expansion. L'expansion *ex vivo* présente l'avantage de permettre d'obtenir des quantités importantes de cellules nécessaires notamment lorsque des administrations répétées sont requises. Elle présente cependant également l'inconvénient d'entraîner un phénomène d'addiction cytokinique qui lorsque l'apport de cytokine est interrompu au moment de l'infusion, entraîne un phénomène massif d'apoptose. Lors de l'utilisation des cellules nourricières dans le processus de fabrication, les chercheurs doivent également garder à l'esprit que le nombre de ces cellules nécessaires à l'expansion des cellules NK à l'échelle clinique est élevé. La culture, le stockage, et le test des cellules nourricières en condition GMP sont donc nécessaires (Fujisaki *et al.*, 2009; Lapteva *et al.*,

2014). De même des protocoles standardisés de cryoconservation des cellules NK pour permettre la délivrance de doses multiples ainsi que l'optimisation et la normalisation des conditions de transport sera nécessaire lors la fabrication des cellules NK par des plateformes centralisées.

Malgré toutes les difficultés décrites ici, les chercheurs continuent à s'intéresser à la thérapie à base de cellules NK pour le cancer au cours des dernières 30 années en raison du fait que les cellules NK ont de nombreuses propriétés qui les rendent attrayantes pour l'application clinique. Outre les nombreuses questions concernant le processus cellulaire de fabrication NK, il reste beaucoup à apprendre en ce qui concerne les cellules NK eux-mêmes. Des études portant sur la cinétique de développement *ex vivo*, la biodistribution *in vivo*, l'hétérogénéité des récepteurs, et le comportement des cellules après modification génétique sont essentielles pour comprendre et à aider à améliorer leur potentiel en tant que thérapeutique du cancer.

Dans la première partie de notre travail, nous avons décrit une méthode d'expansion *ex vivo* des cellules NK. Cette méthode d'expansion a été réalisée à partir de cellules mononucléées triées avec des billes magnétiques anti-CD3 et anti-CD19 a été décrit par d'autres chercheurs (Decot *et al.*, 2010; Eissens *et al.*, 2010). L'originalité de notre méthode à résider dans l'ajout de billes couplées à un anti-CD335 (NKp46) et anti-CD2. D'autres chercheurs ont rapporté des moyens d'expansion et d'entretien des cellules NK (Cho et Campana, 2009; Fujisaki *et al.*, 2009), mais peu de rapports ont porté sur la mise au point d'un protocole qui pourrait être utilisé potentiellement pour l'expansion à grande échelle de cellules NK pour une utilisation clinique.

Dans la première étape, nous avons analysé l'impact des 2 conditions de culture, sur l'amplification, le phénotype et la cytotoxicité des cellules NK amplifiées.

Les deux méthodes de culture ont permis d'obtenir l'expansion des cellules NK. L'ajout des billes à la culture n'a pas permis d'améliorer la capacité d'expansion des cellules NK et ce, quelque soit l'origine des prélèvements.

Nous avons ensuite évalué l'impact de la présence de billes sur le phénotype des cellules NK. Les résultats ont montré que les 2 conditions de culture ont provoqué une augmentation de l'expression des 5 récepteurs après 14 jours d'expansion quelque soit l'échantillon de départ. En présence des billes, une induction significative de NKG2D a été observée entre J0 et J14 sur les cellules de témoins. De même, les billes ont significativement amélioré l'expression de KIR2DL3 entre J0 et J14 et elles ont également influencé significativement l'expression du récepteur KIR2DL3 par rapport à la culture en présence d'IL15 seule, mais seulement sur les cellules de patients.

Nous avons ensuite évalué les effets lytiques des cellules NK cultivées avec IL-15 et IL-15 plus des billes couplées à un anti-CD335 et anti-CD2 envers la lignée cellulaire K562. Les résultats ont montré que les cellules cultivées en présence d'IL-15 plus des billes couplées à anti-CD335 et anti-CD2 ne sont pas significativement plus cytotoxiques que les cellules cultivées en présence d'IL15 seule.

Dans la deuxième étape, nous avons analysé l'impact du G-CSF sur l'amplification, le phénotype et la cytotoxicité des cellules NK amplifiées avec IL-15.

La capacité du G-CSF à mobiliser les progéniteurs a été démontrée et est fréquemment utilisée dans le cadre de la greffe de CSH (Paul *et al.*, 2011; Katarzyna *et al.*, 2012).

Dans cette étude, nous avons évalué si les cellules NK CD56^{bright}CD16⁻ et CD56^{bright}CD16⁺ isolées du sang de donneur sain ou mobilisées par le G-CSF sont équivalentes en terme d'expansion, de phénotype, de cytotoxicité et de sécrétion de cytokines. Nos résultats ont montré que l'expansion maximale des cellules NK a été obtenue à partir du sang de donneur

sain par rapport aux cellules mobilisées. Le pourcentage de cellules NK CD56^{bright}CD16⁺ obtenu à partir de sang de donneurs sains était significativement supérieur à celui obtenu à partir des cellules de patients mobilisés par G-CSF à la fin de la culture. Ceci suggère que le facteur de croissance aurait un impact négatif sur la capacité d'expansion des cellules NK. Les effets immunomodulateurs associés au G-CSF utilisé pour la mobilisation des cellules souches ont été décrits dans un certain nombre d'études (Masahiro *et al.*, 2002; Lindemann *et al.*, 2004; Toh *et al.*, 2009). Bien que les résultats varient entre les études, l'influence des rhG-CSF a été rapportée sur les monocytes (Masahiro *et al.*, 2002), les lymphocytes T (Toh *et al.*, 2009) et les cellules NK (Miller *et al.*, 1997; Lindemann *et al.*, 2004). Cependant ces études montrent des résultats parfois contradictoires concernant l'impact du facteur de croissance sur le nombre absolu des cellules NK et leur proportion au sein des lymphocytes totaux (Tayebi *et al.*, 2001; Trzonkowski *et al.*, 2004). Des essais fonctionnels ont produit des résultats tout aussi contradictoires (Trzonkowski *et al.*, 2004). Il n'y a aucune évidence que les cellules NK expriment le récepteur du G-CSF. En outre, aucun effet de G-CSF n'a été documenté dans une variété de tests *ex vivo*, en utilisant soit des cellules NK sélectionnées ou non sélectionnées (Miller *et al.*, 1997). Plusieurs groupes (Miller *et al.*, 1997; Tayebi *et al.*, 2001; Trzonkowski *et al.*, 2004) déjà démontré que l'administration de rhG-CSF *ex vivo* n'a eu aucun effet sur l'expression de CD2, CD7, CD8, CD16, CD25, CD94, CD161 et les récepteurs NK B1 sur des cellules NK du sang périphérique. Il n'y avait qu'un seul rapport qui suggérait une diminution de la densité d'expression du CD56 à la surface cellulaire, sur les deux types cellulaires CD56^{bright}CD3⁻ et CD56^{dim}CD3⁻ (Taga *et al.*, 1993). Aucun rapport n'a fourni une étude approfondie des récepteurs des cellules NK exprimés sur les différentes sous-populations.

Nous avons ensuite analysé si l'état physiologique (donneurs sains *versus* patients) a influencé la capacité d'expansion des cellules NK ou non. Nos résultats ont montré que les cellules NK mobilisées par le G-CSF quelque soit leur origine ont une capacité d'expansion similaire. Cependant, les cellules NK obtenues à partir de prélèvements de donneurs sains mobilisés par G-CSF ont un pourcentage significativement plus élevé de cellules NK CD56^{bright}CD16⁺ et un pourcentage significativement plus faible de cellules NK CD56^{bright}CD16⁻ en comparaison avec les cellules NK issues de patients mobilisés par G-CSF. Ceci suggère que la maladie aurait un impact sur les capacités d'expansion et de maturation des cellules NK, les cellules CD56^{bright}CD16⁻ traduisant un phénotype plus immature.

Ensuite, nous avons évalué l'impact de l'état physiologique sur le phénotype des cellules NK, nous avons observé une augmentation significative de l'expression des récepteurs KIR2DL3 et KIR2DL5 sur les cellules NK CD56^{bright}CD16⁻ de patients mobilisés par G-CSF par rapport aux donneurs sains mobilisés par G-CSF au jour 7, une augmentation significative de KIR2DL3 expression sur cellules NK CD56^{bright}CD16⁺ de patients mobilisés par G-CSF par rapport au sang des donneurs sains au jour 10, et une diminution significative de l'expression KIR2DL5 sur les cellules NK CD56^{bright}CD16⁺ de patients mobilisés par G-CSF comparés au sang des donneurs sains au jour 0. Nous avons également observé une augmentation significative de l'expression du CD137, un membre de la famille des récepteurs du TNF, sur les cellules NK de donneurs sains à J7 de la culture tandis que celle-ci n'est peu ou pas modifiée à la surface des cellules issues de sources mobilisées par le G-CSF. L'engagement de CD137 par CD137L sur les cellules T activées par l'antigène favorise leur prolifération, leurs fonctions et de survie. Baseeler *et al* ont publié une étude qui a comparé l'expression du CD137 sur les cellules NK provenant de donneurs sains et les patients LAM (Baessler *et al.*, 2010). Cette étude a montré que le CD137 est principalement exprimé sur les cellules activées

saines, mais pas les cellules au repos. Une expression diminuée du CD137 a également été trouvée sur les cellules NK de patients atteints de leucémie. Notre étude a montré notamment qu'il existe une plus faible expression significative de CD137 sur les cellules NK CD56^{bright}CD16⁺ de patients mobilisés par G-CSF.

Beziat *et al* ont démontré que les cellules NK CD56^{bright}CD16⁺ étaient pleinement capables de tuer des cellules cibles (Beziat *et al.*, 2011). Dans nos études, les cellules des patients semblent être moins cytotoxiques que les cellules du sang de donneur sain ou de donneur sain mobilisé par G-CSF, cela peut être dû au pourcentage significativement plus faible de la population de cellules NK CD56^{bright}CD16⁺ parmi des cellules NK des patients mobilisés par G-CSF, à une expression significative de KIR, et à une diminution de l'expression du CD137. La capacité à produire des cytokines pro-inflammatoires et à tuer des cibles sont des caractéristiques importantes des cellules NK activées. Des études antérieures ont documenté la capacité des cellules NK issues de patients atteints de LAM à produire de l'IFN- γ et TNF- α après activation et de tuer efficacement des cellules K562 (Siegler *et al.*, 2005). Dans notre étude, nous avons observé que la production de TNF et IFN γ par les cellules NK de CSP de patients mobilisés a progressivement augmentée après une culture de 14 jours. Cela peut être dû au développement en culture d'une population cellulaire majoritairement CD56^{bright}CD16⁻, capable de produire des cytokines, mais faiblement cytotoxiques.

En résumé, le sang périphérique provenant de donneurs sains a été la source optimale pour les l'expansion des cellules NK. L'administration de G-CSF aux patients diminue la population et la fonctionnalité des cellules NK CD56^{bright}CD16⁺ et favorise le développement d'une population présentant une absence ou une difficulté d'acquisition du CD16, responsable de la médiation du mécanisme de cytotoxicité dépendante des anticorps. Surmonter cette altération de la capacité lymphoïde peut être important pour faciliter l'immunothérapie post-

transplantation. De plus, nous avons observé une surexpression de la plupart des cinq récepteurs après 14 jours de culture, et l'expression de KIR2DL1, KIR2DL3, KIR2DL5 et CD137 était significativement différente entre les trois origines des cellules NK.

Bibliographie

1. Abdel-Wahab O, Levine RL. Mutations in epigenetic modifiers in the pathogenesis and therapy of acute myeloid leukemia. *Blood* 2013; 121:3563-3572.
2. Abea Y, Mutob M, Nieda M, et al. Clinical and immunological evaluation of zoledronate-activated V γ 9 γ δ T-cell-based immunotherapy for patients with multiple myeloma. *Experimental Hematology* 2009; 37:956-968.
3. Baba J, Watanabe S, Saida Y, Tanaka T, Miyabayashi T, Koshio J, et al. Depletion of radio-resistant regulatory T cells enhances antitumor immunity during recovery from lymphopenia. *Blood* 2012; 120:2417-2427.
4. Bachanova V, Cooley S, Defor TE, Verneris MR, Zhang B, McKenna DH, et al. Clearance of acute myeloid leukemia by haploidentical natural killer cells is improved using IL-2 diphtheria toxin fusion protein. *Blood* 2014; 123:3855-3863.
5. Bacher U, Haferlach T, Fehse B, Schnittger S, Kroger N. Minimal residual disease diagnostics and chimerism in the post-transplant period in acute myeloid leukemia. *Scientific World Journal* 2011; 11:310-319.
6. Bacher U, Talano JA, Bishop MR. Monitoring and prevention of relapse after allogeneic hematopoietic cell transplantation for myeloid malignancies. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2012; 18:S62-S73.
7. Bader P, Niethammer D, Willasch A, Kreyenberg H, Klingebiel T. How and when should we monitor chimerism after allogeneic stem cell transplantation? *Bone Marrow Transplant.* 2005; 35:107-119.
8. Bader P, Willasch A, Klingebiel T. Monitoring of post-transplant remission of childhood malignancies: is there a standard. *Bone Marrow Transplant.* 2008; 42(Suppl. 2):S31-S34.
9. Baessler T, Charton JE, Schimiedel BJ, et al. CD137 ligand mediates opposite effects in

-
- human and mouse NK cells and impairs NK-cell reactivity against human acute myeloid leukemia cells. *Blood* 2010; 115:3058-3069.
10. Baggio L, Laureano AM, da Rocha Silla LM, Lee DA. Natural killer cell adoptive immunotherapy: coming of age. *Clin. Immunol.* 2016; <http://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2016.02.003>.
 11. Baier C, Fino A, Sanchez C, Farnault L, Rihet P, Kahn-Perles B, et al. Natural killer cells modulation in hematological malignancies. *Front. Immunol.* 2013; 4:459.
 12. Bar M, Sandmaier BM, Inamoto Y, et al. Donor lymphocyte infusion for relapsed hematological malignancies after allogeneic hematopoietic cell transplantation: prognostic relevance of the initial CD3+ T cell dose. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2013; 19:949-957.
 13. Baron F, Baker JE, Strob R, Gooley TA, Sandmaier BM, Mickael B, et al. Kinetics of engraftment in patients with hematological malignancies given allogeneic hematopoietic cell transplantation after non-myeloablative conditioning. *Blood* 2004; 104:2254-2262.
 14. Baron F, Sandmaier BM. Chimerism and outcomes after allogeneic hematopoietic cell transplantation following nonmyeloablative conditioning. *Leukaemia* 2006; 20:1690-1700.
 15. Barrett AJ. Understanding and harnessing the graft-versus-leukaemia effect. *Br J Haematol.* 2008; 142:877-888.
 16. Becknell B, Caligiuri MA. Interleukin-2, interleukin-15, and their roles in human natural killer cells. *Adv. Immunol.* 2005; 86:209-239.
 17. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) cooperative group. *Br J Haematol.* 1976; 33: 451-458.

-
18. Berg M, Childs R. Ex-vivo expansion of NK cells: what is the priority-high yield or high purity? *Cytotherapy*. 2010; 12:969-970.
 19. Berg M, Lundqvist A, Betters D, Childs RW. In vitro expanded NK cells have increased natural cytotoxicity receptors, TRAIL and NKG2D expression, and superior tumor cytotoxicity compared to short-term IL-2-activated NK cells [abstract]. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*. 2009; 114:463.
 20. Berg M, Lundqvist A, McCoy P Jr, Samsel L, Fan Y, Tawab A, et al. Clinical-grade ex vivo-expanded human natural killer cells up-regulate activating receptors and death receptor ligands and have enhanced cytolytic activity against tumor cells. *Cytotherapy*. 2009; 11:341-355.
 21. Berrien-Elliott MM, Wagner JA, Fehniger TA. Human cytokine-induced memory-like natural killer cells. *J. Innate Immun*. 2015; 7:563-571.
 22. Beziat V, Duffy D, Quoc SN, et al. CD56^{bright}CD16⁺ NK cells: a functional intermediate stage of NK cell differentiation. *The journal of immunology*. 2011; 186: 6753-6761.
 23. Blom B, Spits H. Development of human lymphoid cells. *Annu Rev Immunol* 2006; 24: 287-320.
 24. Boissel L, Tuncer HH, Betancur M, Wolfberg A, Klingemann H. Umbilical cord mesenchymal stem cells increase expansion of cord blood natural killer cells. *Biol. Blood Marrow Transplant*. 2008; 14:1031-1038.
 25. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med*. 1997; 3:730-737.
 26. Bonneville M, O'Brien RL, Born WK. $\gamma\delta$ T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat. Rev. Immunol*. 2010; 10:467- 478.
 27. Brehm C, Huenecke S, Quaiser A, et al. IL-2 stimulated but not unstimulated NK cells

-
- induce selective disappearance of peripheral blood cells: concomitant results to a phase I/II study. *PLoS ONE*. 2011; 6:e27351.
28. Brown CMS, Larsen SR, Iland HJ, Joshua DE, Gibson J. Leukaemias into the 21st century: part 1: the acute leukaemias. *Clinical perspectives* 2012; 1179-1186.
 29. Burnett AK, Russell NH, Kell J, et al. European development of clofarabine as treatment for older patients with acute myeloid leukemia considered unsuitable for intensive chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2010; 28:2389-2395.
 30. Burnett RC, Thirman MJ, Rowley JD, Diaz MO. Molecular analysis of the T-cell acute lymphoblastic leukemia-associated t(1;7)(p34;q34) that fuses LCK and TCRB. *Blood* 1994; 84:1232-1236.
 31. Burns LJ, Weisdorf DJ, DeFor TE, Vesole DH, Repka TL, Blazar BR, et al. IL-2-based immunotherapy after autologous transplantation for lymphoma and breast cancer induces immune activation and cytokine release: a phase I/II trial. *Bone Marrow Transplant*. 2003; 32:177-186.
 32. Carson WE, Giri JG, Lindemann MJ, Linett ML, Ahdieh M, Paxton R, et al. Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor. *J Exp Med*. 1994; 180:1395-1403.
 33. Chalandon Y, Schwaller J. Targeting mutated protein tyrosine kinases and their signaling pathways in hematologic malignancies. *Haematologica*. 2005; 90:949-968.
 34. Chapuis AG, Ragnarsson GB, Nguyen HN, et al. Transferred WT1-reactive CD8+ T cells can mediate antileukemic activity and persist in post-transplant patients. *Sci Transl Med*. 2013; 5:174-198.
 35. Chiarini F, Lonetti A, Evangelisti C, Buontempo F, Orsini E, Evangelisti C, et al. Advances in understanding the acute lymphoblastic leukemia bone marrow

-
- microenvironment: From biology to therapeutic targeting. *Biochimica et Biophysica Acta* 2016; 1863:449-463.
36. Chiesa S, Tomasello E, Vivier E, Vély F. Coordination of activating and inhibitory signals in natural killer cells. *Mol Immunol.* 2005; 42:477-484.
 37. Childs RW, Berg M. Bringing natural killer cells to the clinic: ex vivo manipulation. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2013; 2013:234-246.
 38. Cho D, Campana D. Expansion and activation of natural killer cells for cancer immunotherapy. *Korean J Lab Med.* 2009; 29:89-96.
 39. Choi I, Yoon SR, Park SY, Kim H, Jung SJ, Jang YJ, et al. Donor-derived natural killer cells infused after human leukocyte antigen-haploidentical hematopoietic cell transplantation: a dose-escalation study. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014; 20:696-704.
 40. Ciurea SO, Andersson BS. Busulfan in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2009; 15:523-536.
 41. ClinicalTrials.gov. Clofarabine or daunorubicin hydrochloride and cytarabine followed by decitabine or observation in treating older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia. 2009. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01041703?term=clofarabine+daunorubicin+aml&rank=1>. [Accessed 28 July 2012]
 42. ClinicalTrials.gov. Dose escalation of clofarabine in combination with cytarabine and idarubicin as induction therapy in high risk AML (CIARA). 2012. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01534702?term=clofarabine+aml+induction&rank=1>. [Accessed 28 July 2012]

-
43. ClinicalTrials.gov. Study of elacytarabine versus investigator's choice in patients with late stage acute myeloid leukaemia (AML) (CLAVELA). 2010. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01147939?term=elacytarabine+aml&rank=1>. [Accessed 28 July 2012]
 44. ClinicalTrials.gov. Study of vosaroxin or placebo in combination with cytarabine in patients with first relapsed or refractory acute myeloid leukemia (AML) (VALOR) [updated 19 July 2012]. 2010. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01191801?term=vosaroxin&rank=1>. [Accessed 28 July 2012]
 45. Colmone A, Amorim M, Pontier AL, Wang S, Jablonski E, Sipkins DA. Leukemic cells create bonemarrow niches that disrupt the behavior of normal hematopoietic progenitor cells. *Science* 2008; 322:1861-1865.
 46. Colucci F, Caligiuri MA, Di Santo JP. What does it take to make a natural killer? *Nat Rev Immunol.* 2003; 3:413-425.
 47. Conlon KC, Lugli E, Welles HC, Rosenberg SA, Fojo AT, Morris JC, et al. Redistribution, hyperproliferation, activation of natural killer cells and CD8 T cells, and cytokine production during first-in-human clinical trial of recombinant human interleukin-15 in patients with cancer, *J. Clin. Oncol.* 2015; 33:74-82.
 48. Cooley S, Trachtenberg E, Bergemann TL, Saeteurn K, Klein J, Le CT, et al. Donors with group B KIR haplotypes improve relapse-free survival after unre-lated hematopoietic cell transplantation for acute myelogenous leukemia. *Blood* 2009; 113:726-732.
 49. Cooper MA, Bush JE, Fehniger TA, VanDeusen JB, Waite RE, Liu Y, et al. In vivo evidence for a dependence on interleukin 15 for survival of natural killer cells. *Blood* 2002; 100:3633-3638.

-
50. Cooper MA, Elliott JM, Keyel PA, Yang L, Carrero JA, Yokoyama WM. Cytokine induced memory-like natural killer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2009; 106:1915-1919.
 51. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol.* 2001; 22:633-640.
 52. Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, Chen KS, Ghaehri BA, Ghayur T, et al. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56^{bright} subset. *Blood* 2001; 97:3146-3151.
 53. Cornelissen JJ, Versluis J, Passweg JR, et al. Comparative therapeutic value of post-remission approaches in patients with acute myeloid leukemia aged 40-60 years. *Leukemia* 2015; 29:1041-1050.
 54. Curti A, Ruggeri L, D'Addio A, Bontadini A, Dan E, Motta MR, et al. Successful transfer of alloreactive haploidentical KIR ligand-mismatched natural killer cells after infusion in elderly high risk acute myeloid leukaemia patients. *Blood* 2011; 118:3273-3279.
 55. Davis DM. Assembly of the immunological synapse for T cells and NK cells. *Trends Immunol.* 2002; 23:356-363.
 56. DeBlaker-Hohe DF, Yamauchi A, Yu CR, Horvath-Arcidiacono JA, Bloom ET. IL-12 synergizes with IL-2 to induce lymphokine-activated cytotoxicity and perforin and granzyme gene expression in fresh human NK cells. *Cell. Immunol.* 1995; 165:33-43.
 57. Decot V, Voillard L, Latger-Cannard V, et al. Natural-killer cell amplification for adoptive leukemia relapse immunotherapy: comparison of three cytokines, IL-2, IL-15, or IL-7 and impact on NKG2D, KIR2DL1, and KIR2DL2 expression. *Experimental hematology* 2010; 38:351-362.
 58. Deol A, Lum LG. Role of donor lymphocyte infusions in relapsed hematological

-
- malignancies after stem cell transplantation revisited. *Cancer Treat Rev.* 2010; 36:528-538.
59. Denman CJ, Senyukov VV, Somanchi SS, Phatarpekar PV, Kopp LM, Johnson JL, et al. Membrane-bound IL-21 promotes sustained ex vivo proliferation of human natural killer cells. *PLoS One* 2012; 7:e30264.
60. Dezell SA, Ahn YO, Spanholtz J, et al. Natural killer cell differentiation from hematopoietic stem cells: a comparative analysis of heparin- and stromal cell-supported methods. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2012; 18:536-545.
61. Diez-Campelo M, Perez-Simon JA, Perez J et al. Minimal residual disease monitoring after allogeneic transplantation may help to individualize post-transplant therapeutic strategies in acute myeloid malignancies. *Am. J. Hematol.* 2009; 84:149-152.
62. Dohner H, Estey EH, Amadori S, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 2010; 115:453-474.
63. Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, Yang JC, Hwu P, Schwartzentruber DJ, et al. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* 2002; 298:850-854.
64. Duhrsen U, Hossfeld DK. Stromal abnormalities in neoplastic bone marrow diseases. *Ann. Hematol.* 1996; 73:53-70.
65. Faderl S, O'Brien S, Pui C-H, Stock W, Wetzler M, Hoelzer D, et al. Adult acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* 2010; 116:1165-1176.
66. Faderl S, Ravandi F, Huang X, et al. A randomized study of clofarabine versus clofarabine plus low-dose cytarabine as front-line therapy for patients aged 60 years and

-
- older with acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome. *Blood* 2008; 112:1638-1645.
67. Farag SS, Bacigalupo A, Eapen M, Hurley C, Dupont B, Caligiuri MA, et al. The effect of KIR ligand incompatibility on the outcome of unrelated donor transplantation: a report from the center for international blood and marrow transplant research, the European blood and marrow transplant registry, and the Dutch registry. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2006; 12:876-884.
68. Farag SS, Fehniger TA, Ruggeri L, Velardi A, Caligiuri MA. Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. *Blood* 2002; 100:1935-1947.
69. Fehniger TA, Caligiuri MA. Interleukin 15: biology and relevance to human disease, *Blood* 2001; 97:14-32.
70. Fehniger TA, Cooper MA, Caligiuri MA. Interleukin-2 and interleukin-15: immunotherapy for cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2002; 13:169-183.
71. Fehniger TA, Cooper MA, Nuovo GJ, et al. CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood* 2003; 101:3052-3057.
72. Feldman EJ, Lancet JE, Kolitz JE, et al. First-in-man study of CPX-351: a liposomal carrier containing cytarabine and daunorubicin in a fixed 5:1 molar ratio for the treatment of relapsed and refractory acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol.* 2011; 29:979-985.
73. Ferlazzo G, Thomas D, Lin SL, et al. The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytolytic. *J Immunol.* 2004; 172:1455-1462.
74. Foley B, Cooley S, Verneris MR, Curtsinger J, Luo X, Waller EK, et al. NK cell

-
- education after allogeneic transplantation: dissociation between recovery of cytokine-producing and cytotoxic functions. *Blood* 2011; 118:2784-2792.
75. Foley B, De Santis D, Lathbury L, Christiansen F, Witt C. KIR2DS1-mediated activation overrides NKG2A-mediated inhibition in HLA-C C2-negative individuals. *Int Immunol.* 2008; 20:555-563.
76. Fox BA, Schendel DJ, Butterfield LH, Aamdal S, Allison JP, Ascierto PA, Atkins MB, Bartunkova J, Bergmann L, Berinstein N, et al. Defining the critical hurdles in cancer immunotherapy. *J Transl Med.* 2011; 9:214.
77. Freud AG, Caligiuri MA. Human natural killer cell development. *Immunol Rev.* 2006; 214:56-72.
78. Fridman WH, Galon J, Pages F, Tartour E, Sautes-Fridman C, Kroemer G. Prognostic and predictive impact of intra- and peritumoral immune infiltrates. *Cancer Res.* 2011; 71:5601-5605.
79. Fuchshuber PR, Lotzova E, Pollock RE. Antitumor activity, growth, and phenotype of long-term IL-2 cultures of human NK and T lymphocytes, *Lymphokine Cytokine Res.* 1991; 10:51-59.
80. Fujisaki H, Kakuda H, Shimasaki N, Imai C, Ma J, Lockey T, et al. Expansion of highly cytotoxic human natural killer cells for cancer cell therapy, *Cancer Res.* 2009; 69:4010-4017.
81. Giuliani M, Giron-Michel J, Negrini S, Vacca P, Durali D, Caignard A, et al. Generation of a novel regulatory NK cell subset from peripheral blood CD34⁺ progenitors promoted by membrane-bound IL-15. *PLoS One* 2008; 3:e2241.
82. Godder KT, Henslee-Downey PJ, Mehta J, et al. Long term disease-free survival in acute leukemia patients recovering with increased $\gamma\delta$ T cells after partially mismatched related

-
- donor bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation*. 2007; 39:751-757.
83. Goldstone AH, Richards SM, Lazarus HM, Tallman MS, Buck G, Fielding AK, et al. In adults with standard-risk acute lymphoblastic leukemia, the greatest benefit is achieved from a matched sibling allogeneic transplantation in first complete remission, and an autologous transplantation is less effective than conventional consolidation/maintenance chemotherapy in all patients: final results of the International ALL Trial (MRC UKALL XII/ECOG E2993). *Blood* 2008; 111:1827-1833.
84. Graux C, Cools J, Melotte C, Quentmeier H, Ferrando A, Levine R, et al. Fusion of NUP214 to ABL1 on amplified episomes in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* 2004; 36:1084-1089.
85. Graux C, Cools J, Michaux L, Vandenberghe P, Hagemeijer A. Cytogenetics and molecular genetics of T-cell acute lymphoblastic leukemia: from thymocyte to lymphoblast. *Leukemia* 2006; 20:1496-1510.
86. Grzywacz B, Kataria N, Kataria N, Blazar BR, Miller JS, Verneris MR. Natural killer-cell differentiation by myeloid progenitors. *Blood* 2011; 117:3548-3558.
87. Grzywacz B, Kataria N, Sikora M, Oostendorp RA, Dzierzak EA, Blazar BR, et al. Coordinated acquisition of inhibitory and activating receptors and functional properties by developing human natural killer cells. *Blood* 2006; 108:3824-3833.
88. Guillerey C, Smyth MJ. NK cells and cancer immunoediting. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2015.
89. Gumá M, Angulo A, Vilches C, Gómez-Lozano N, Malats N, López-Botet M. Imprint of human cytomegalovirus infection on the NK cell receptor repertoire. *Blood* 2004; 104:3664-3671.

-
90. Harada H, Watanabe S, Saijo K, Ishiwata I, Ohno T. A Wilms tumor cell line, HFWT, can greatly stimulate proliferation of CD56⁺ human natural killer cells and their novel precursors in blood mononuclear cells. *Exp Hematol.* 2004; 32:614-621.
 91. Harrison CJ, Foroni L. Cytogenetics and molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *Rev Clin Exp Hematol.* 2002; 6:91-113.
 92. Hayday A, Tigelaar R. Immunoregulation in the tissues by $\gamma\delta$ T cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2003; 3:233-242.
 93. Hayday AC. $\gamma\delta$ T cells and the lymphoid stress-surveillance response. *Immunity.* 2009; 31:184-196.
 94. Herberman RB, Nunn ME, Lavrin DH. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. *Int J Cancer.* 1975; 16:216-229.
 95. Hercend T, Meuer S, Reinherz EL, Schlossman SF, Ritz J. Generation of a cloned NK cell line derived from the "null cell" fraction of human peripheral blood. *J Immunol.* 1982; 129:1299-1305.
 96. Herr AL, Labopin M, Blaise D, et al. HLA-identical sibling allogeneic peripheral blood stem cell transplantation with reduced intensity conditioning compared to autologous peripheral blood stem cell transplantation for elderly patients with de novo acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2007; 21:129-135.
 97. Holowiecki J, Grosicki S, Giebel S, et al. Cladribine, but not fludarabine, added to daunorubicin and cytarabine during induction prolongs survival of patients with acute myeloid leukemia: a multicenter, randomized phase III study. *J Clin Oncol.* 2012; 30: 2441-2448.

-
98. Horwitz ME. Reduced intensity versus myeloablative allogeneic stem cell transplantation for the treatment of acute myeloid leukemia, myelodysplastic syndrome and acute lymphoid leukemia. *Curr Opin Oncol.* 2011; 23:197-202.
 99. Hsu KC, Gooley T, Malkki M, Pinto-Agnello C, Dupont B, Bignon JD, et al. KIR ligands and prediction of relapse after unrelated donor hematopoietic cell transplantation for hematologic malignancy. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2006; 12:828-836.
 100. Huan J, Hornick NI, Shurtleff MJ, Skinner AM, Goloviznina NA, Roberts CT, et al. RNA trafficking by acute myelogenous leukemia exosomes, *Cancer Res.* 2013; 73:918-929.
 101. Huang XJ, Liu DH, Liu KY, Xu LP, Chen H, Han W. Donor lymphocyte infusion for the treatment of leukemia relapse after HLA-mismatched/haploidentical T-cell-replete hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica.* 2007; 92:414-417.
 102. Huff CA, Fuchs EJ, Smith BD, et al. Graft-versus-host reactions and the effectiveness of donor lymphocyte infusions. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2006; 12:414-421.
 103. Ikawa T, Kawamoto H, Fujimoto S, Katsura Y. Commitment of common T/natural killer (NK) progenitors to unipotent T and NK progenitors in the murine fetal thymus revealed by a single progenitor assay. *J Exp Med.* 1999; 190:1617-1626.
 104. Imai C, Iwamoto S, Campana D. Genetic modification of primary natural killer cells overcomes inhibitory signals and induces specific killing of leukemic cells. *Blood* 2005; 106:376-383.
 105. Introna M, Borleri G, Conti E, et al. Repeated infusions of donor-derived cytokine-induced killer cells in patients relapsing after allogeneic stem cell transplantation: a phase I study. *Haematologica.* 2007; 92:952.
 106. Introna M, Pievani A, Borleri G, et al. Feasibility and safety of adoptive immunotherapy with CIK cells after cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2010;

-
- 16:1603-1607.
107. Ishii K, Barrett AJ. Novel immunotherapeutic approaches for the treatment of acute leukemia (myeloid and lymphoblastic). *Ther Adv Hematol*. 2016; 7:17-39.
108. Iyengar R, Handgretinger R, Babarin-Dorner A, Leimig T, Otto M, Geiger TL, et al. Purification of human natural killer cells using a clinical-scale immunomagnetic method. *Cytotherapy* 2003; 5:479-484.
109. Jacquet EG, Schanie CL, Fugier-Vivier I, Willer SS, Ildstad ST. Facilitating cells as a venue to establish mixed chimerism and tolerance. *Pediatr Transplant* 2003; 7:348-357.
110. Jameson J, Havran WL. Skin $\gamma\delta$ T-cell functions in homeostasis and wound healing. *Immunol. Rev.* 2007; 215:114-122.
111. Jing JT, Wu CP, Lu BF. Cytokine-induced killer cells promote antitumor immunity. *Journal of Translational Medicine* 2013; 11:83
112. Kabelitz D. Function and specificity of human gamma/delta-positive T cells. *Crit. Rev. Immunol.* 1992; 11:281-303.
113. Kaminski BA, Kadereit S, Miller RE, Leahy P, Stein KR, Topa DA, et al. Reduced expression of NFAT-associated genes in UCB versus adult CD4+ T lymphocytes during primary stimulation. *Blood*. 2003; 102:4608-4617.
114. Kantarjian H, Thomas D, O'Brien S, Cortes J, Giles F, Jeha S *et al.* Long-term follow-up results of hyperfractionated cyclophosphamide, vincristine, doxorubicin, and dexamethasone (Hyper-CVAD), a dose-intensive regimen, in adult acute lymphocytic leukemia. *Cancer* 2004; 101:2788-2801.
115. Kantarjian HM, Erba HP, Claxton D, et al. Phase II study of clofarabine monotherapy in previously untreated older adults with acute myeloid leukemia and unfavorable prognostic factors. *J Clin Oncol* 2010; 28:549-555.

-
- 116.Katarzyna BK, Anna G, Katarzyna G, *et al.* Genetic variant of the G-CSF receptor gene is associated with lower mobilization potential and slower recovery of granulocytes after transplantation of autologous peripheral blood progenitor cells. *Cytokine* 2012; 60:463-467.
- 117.Keating A, DaSilva G, Perez WS, *et al.* Autologous blood cell transplantation versus HLA-identical sibling transplantation for acute myeloid leukemia in first complete remission: a registry study from the Center for International Blood and Marrow Transplantation Research. *Haematologica*. 2013; 98:185-192.
- 118.Kelly LM, Gilliland DG. Genetics of myeloid leukemias. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2002; 3:179-198.
- 119.Kiessling R, Klein E, Wigzell H. Natural killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur J Immunol.* 1975; 5:112-117.
- 120.Kim EK, Ahn YO, Kim S, Kim TM, Keam B, Heo DS. Ex vivo activation and expansion of natural killer cells from patients with advanced cancer with feeder cells from healthy volunteers. *Cytotherapy* 2013; 15:231-241 e231.
- 121.Kim S, Poursine-Laurent J, Truscott SM, Lybarger L, Song YJ, Yang L, *et al.* Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature* 2005; 436:709-713.
- 122.Klingemann HG, Martinson J. Ex vivo expansion of natural killer cells for clinical applications. *Cytotherapy* 2004; 6:15-22.
- 123.Knorr DA, Kaufman DS. Pluripotent stem cell-derived natural killer cells for cancer therapy. *Transl Res.* 2010; 156:147-154.

-
124. Knorr DA, Ni Z, Hermanson D, Hexum MK, Bendzick L, Cooper LJ, et al. Clinical-scale derivation of natural killer cells from human pluripotent stem cells for cancer therapy. *Stem Cells Transl Med.* 2013; 2:274-283.
125. Koehl U, Brehm C, Huenecke S, Zimmermann SY, Kloess S, Bremm M, et al. Clinical grade purification and expansion of NK cell products for an optimized manufacturing protocol. *Front. Oncol.* 2013; 3:118.
126. Koehla U, Sorensena J, Esser R, et al. IL-2 activated NK cell immunotherapy of three children after haploidentical stem cell transplantation. *Blood Cells, Molecules, and Diseases.* 2004; 33:261-266.
127. Kroger N, Binder T, Zabelina T, Wolschke C, Schieder H, Renges H, et al. Low number of donor activating killer immunoglobulin-like receptors (KIR) genes but not KIR-ligand mismatch prevents relapse and improves disease-free survival in leukemia patients after in vivo T-cell depleted unrelated stem cell transplantation. *Transplantation* 2006; 82: 1024-1030.
128. Krzewski K, Strominger JL. The killer's kiss: the many functions of NK cell immunological synapses. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2008; 20:597-605.
129. Lamb LS Jr, Henslee-Downey PJ, Parrish RS, et al. Increased frequency of TCR gamma delta T cells in disease-free survivors following T cell-depleted, partially mismatched, related donor bone marrow transplantation for leukemia. *J Hematother.* 1996; 5:503-509.
130. Lancet JE, Ravandi F, Ricklis RM, et al. A phase Ib study of vosaroxin, an anticancer quinolone derivative, in patients with relapsed or refractory acute leukemia. *Leukemia* 2011; 25:1808-1814.

-
- 131.Lang P, Pfeiffer M, Handgretinger R, Schumm M, Demirdelen B, Stanojevic S, et al. Clinical scale isolation of T cell depleted CD56⁺ donor lymphocytes in children. *Bone Marrow Transplant.* 2002; 29:497-502.
- 132.Lanier LL. NK cell recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 2005; 23:225-274.
- 133.Lanier LL, Chang C, Phillips JH. Human NKR-P1A. A disulfide-linked homodimer of the C-type lectin superfamily expressed by a subset of NK and T lymphocytes. *J Immunol.* 1994; 153:2417-2428.
- 134.Laport GG, Sheehan K, Baker J, et al. Adoptive immunotherapy with cytokine- induced killer cells for patients with relapsed hematologic malignancies after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2011; 17:1679-1687.
- 135.Lapteva N, Durett AG, Sun J, Rollins LA, Huye LL, Fang J, et al. Large-scale ex vivo expansion and characterization of natural killer cells for clinical applications. *Cytotherapy* 2012; 14:1131-1143.
- 136.Lapteva N, Szmania SM, van Rhee F, Rooney CM. Clinical grade purification and expansion of natural killer cells. *Crit. Rev. Oncog.* 2014; 19:121-132.
- 137.Lapteva1 N, Szmania SM, van Rhee F, Rooney CM. Clinical grade purification and expansion of natural killer cells. *Crit Rev Oncog.* 2014 ; 19:121-132.
- 138.Leemhuis T, Wells S, Scheffold C, Edinger M, Negrin RS. A phase I trial of autologous cytokine-induced killer cells for the treatment of relapsed Hodgkin disease and non-Hodgkin lymphoma. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2005; 11:181-187.
- 139.Leung W. Use of NK cell activity in cure by transplant. *British Journal of Haematology,* 2011; 155:14-29.
- 140.Ley TJ, Miller C, Ding L, et al. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2013; 368:2059-2074.

-
141. Liesveld JL, Rothberg PG. Mixed chimerism in SCT: conflict or peaceful coexistence? *Bone Marrow Transplant* 2008; 42:297-310.
142. Liga M, Triantafyllou E, Tiniakou M, et al. High alloreactivity of low-dose prophylactic donor lymphocyte infusion in patients with acute leukemia undergoing allogeneic hematopoietic cell transplantation with an alemtuzumab-containing conditioning regimen. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2013; 19:75-81.
143. Lindemann M, Rebmann V, Ottinger HD, et al. rhG-CSF effect on mixed lymphocyte cultures and circulating soluble HLA antigen levels in volunteer stem cell donors. *Exp. Hematol*. 2004; 32:1103-1109.
144. Linn YC, Niam M, Chu S, et al. The anti-tumour activity of allogeneic cytokine-induced killer cells in patients who relapse after allogeneic transplant for haematological malignancies. *Bone Marrow Transplantation* 2012; 47:957-966.
145. Liu Y, Wu HW, Sheard MA, et al. Growth and activation of natural killer cells ex vivo from children with neuroblastoma for adoptive cell therapy. *Clin Cancer Res*. 2013; 19:2132-2143.
146. Ljunggren HG and Kärre K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol. Today* 1990; 11:237-244.
147. Locatelli F, Merli P, Rutella S. At the Bedside: Innate immunity as an immunotherapy tool for hematological malignancies. *Journal of Leukocyte Biology*. 2013; 94:1141-1157.
148. Lotze MT, Line BR, Mathisen DJ, Rosenberg SA. The in vivo distribution of autologous human and murine lymphoid cells grown in T cell growth factor (TCGF): implications for the adoptive immunotherapy of tumors. *J Immunol*. 1980; 125:1487-1493.

-
- 149.Lowdell MW, Lamb L, Hoyle C, Velardi A, Prentice HG. Non-MHC-restricted cytotoxic cells: their roles in the control and treatment of leukaemias. *Br J Haematol* 2001; 114:11-24.
- 150.Loza MJ, Zamai L, Azzoni L, Rosati E, Perussia B. Expression of type 1 (interferon gamma) and type 2 (interleukin-13, interleukin-5) cytokines at distinct stages of natural killer cell differentiation from progenitor cells, *Blood* 2002; 99:1273-1281.
- 151.Lu PH, Negrin RS. A novel population of expanded human CD3+CD56+ cells derived from T cells with potent in vivo antitumor activity in mice with severe combined immunodeficiency. *J Immunol.* 1994; 153:1687-1696.
- 152.Luevano M, Madrigal A, Saudemont A. Generation of natural killer cells from hematopoietic stem cells in vitro for immunotherapy. *Cell Mol Immunol.* 2012; 9:310-320.
- 153.Luhm J, Brand JM, Koritke P, Hoppner M, Kirchner H, Frohn C. Large-scale generation of natural killer lymphocytes for clinical application. *J Hematother Stem Cell Res.* 2002; 11:651-657.
- 154.Lundqvist A, Abrams SI, Schrump DS, et al. Bortezomib and depsipeptide sensitize tumors to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand: a novel method to potentiate natural killer cell tumor cytotoxicity. *Cancer Res.* 2006; 66:7317-7325.
- 155.Lundqvist A, Su S, Rao S, Childs R. Cutting edge: bortezomib-treated tumors sensitized to NK cell apoptosis paradoxically acquire resistance to antigen-specific T cells. *J Immunol.* 2010; 184:1139-1142.
- 156.Lundqvist A, Yokoyama H, Smith A, Berg M, Childs R. Bortezomib treatment and regulatory T-cell depletion enhance the antitumor effects of adoptively infused NK cells. *Blood* 2009; 113:6120-6127.

-
157. Marcucci G, Haferlach T, Dohner H. Molecular genetics of adult acute myeloid leukemia: prognostic and therapeutic implications. *J Clin Oncol.* 2011; 29:475-486.
158. Marijt WAE, Heemskerk MHM, Kloosterboer FM, et al. Hematopoiesis- restricted minor histocompatibility antigens HA-1- or HA-2-specific T cells can induce complete remissions of relapsed leukemia. *Medical sciences.* 2003; 100:2742-2747.
159. Marijt WAE, van der Hoorn M, van Bergen C, et al. Phase I/II feasibility study evaluating the generation of leukemia-reactive cytotoxic T lymphocyte lines for treatment of patients with relapsed leukemia after allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica.* 2007; 92:72-80.
160. Masahiro S, Nobutaka K, Tomoko T, et al. Granulocyte colony-stimulating factor directly affects human monocytes and modulates cytokine secretion. *Exp. Hematol.* 2002; 30: 1115-1123.
161. Mehdipour P, Santoro F, Minucci S. Epigenetic alterations in acute myeloid leukemias. *FEBS J.* 2015; 282: 1786-1800.
162. Mendelson A, Frenette PS. Hematopoietic stem cell niche maintenance during homeostasis and regeneration, *Nat. Med.* 2014; 20:833-846.
163. McKenna DH Jr, Sumstad D, Bostrom N, Kadidlo DM, Fautsch S, McNearney S, et al. Good manufacturing practices production of natural killer cells for immunotherapy: a six-year single-institution experience. *Transfusion* 2007; 47:520-528.
164. McQueen KL, Dorigi KM, Guethlein LA, Wong R, Sanjanwala B, Parham P. Donor-recipient combinations of group A and B KIR haplotypes and HLA class I ligand affect the outcome of HLA-matched, sibling donor hematopoietic cell transplantation. *Hum Immunol.* 2007; 68:309-323.
165. Michallet AS, Nicolini F, Furst S, et al. Outcome and long-term follow-up of alloreactive

-
- donor lymphocyte infusions given for relapse after myeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantations (HSCT). *Bone Marrow Transplant.* 2005; 35:601-608.
166. Miller JS. Therapeutic applications: natural killer cells in the clinic. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program* 2013; 2013:247-253.
167. Miller JS, Cooley S, Parham P, Farag SS, Verneris MR, McQueen KL, et al. Missing KIR ligands are associated with less relapse and increased graft-versus-host disease (GVHD) following unrelated donor allogeneic HCT. *Blood* 2007; 109:5058-5061.
168. Miller JS, Prosper F, McCullar V. Natural killer (NK) cells are functionally abnormal and NK cell progenitors are diminished in granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood progenitor cell collections. *Blood* 1997; 90:3098-3105.
169. Miller JS, Soignier Y, Panoskaltis-Mortari A, McNearney SA, Yun GH, Fautsch SK, et al. Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. *Blood* 2005; 105:3051-3057.
170. Miller JS, Warren EH, van den Brink MRM, et al. NCI first international workshop on the biology, prevention, and treatment of relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: report from the committee on the biology underlying recurrence of malignant disease following allogeneic HSCT: Graft-versus-Tumor/Leukemia reaction. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2010; 16:565-586.
171. Mitchison NA. Studies on the immunological response to foreign tumor transplants in the mouse. I. The role of lymph node cells in conferring immunity by adoptive transfer. *J Exp Med.* 1955; 102:157-177.
172. Mocellin S, Panelli M, Wang E, Rossi CR, Pilati P, Nitti D, et al. IL-10 stimulatory effects on human NK cells explored by gene profile analysis. *Genes Immun.* 2004; 5:

621-630.

173. Montero A, Savani BN, Shenoy A, et al. T cell depleted peripheral blood stem cell allo-transplantation with T cell add back for patients with hematological malignancies: effect of chronic GVHD on outcome. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2006; 12:1318-1325.
174. Moretta L, Bottino C, Cantoni C, Mingari MC, Moretta A. Human natural killer cell function and receptors. *Curr Opin Pharmacol.* 2001; 1:387-391.
175. Morrison SJ, Scadden DT, The bone marrow niche for haematopoietic stem cells, *Nature* 2014; 505:327-334.
176. Mothy M, Avinens O, Faucher C, Viens P, Chouffi B, Bilger K, et al. Predictive factors and impact of full donor T-cell chimerism after reduced intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica* 2007; 92:1004-1006.
177. Mule JJ, Shu S, Schwarz SL, Rosenberg SA. Adoptive immunotherapy of established pulmonary metastases with LAK cells and recombinant interleukin-2. *Science* 1984; 225:1487-1489.
178. Mullighan CG. Molecular genetics of B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest.* 2012; 122:3407-3415.
179. Mullighan CG, Goorha S, Radtke I, et al. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 2007; 446:758-764.
180. Murre C. Intertwining proteins in thymocyte development and cancer. *Nat Immunol* 2000; 1:97-98.
181. Nanno M, Shiohara T, Yamamoto H, et al. $\gamma\delta$ T cells: firefighters or fire boosters in the front lines of inflammatory responses. *Immunol Rev.* 2007; 5:103-113.
182. Nguyen S, Dhedin N, Vernant JP, Kuentz M, Al Jijakli A, Rouas-Freiss N, et al. NK-cell reconstitution after haploidentical hematopoietic stem-cell transplantations: immaturity of

-
- NK cells and inhibitory effect of NKG2A override GvL effect. *Blood* 2005; 105:4135-4142.
183. Nguyen S, Kuentz M, Vernant JP, Dhedin N, Bories D, Debre P, et al. Involvement of mature donor T cells in the NK cell reconstitution after haploidentical hematopoietic stem-cell transplantation. *Leukemia* 2008; 22:344-352.
184. Ochoa AC, Gromo G, Alter BJ, Sondel PM, Bach FH: Long-term growth of lymphokine-activated killer (LAK) cells: role of anti-CD3, beta-IL 1, interferon-gamma and -beta. *J Immunol.* 1987; 138:2728-2733.
185. Orange JS. Formation and function of the lytic NK-cell immunological synapse. *Nat. Rev. Immunol.* 2008; 8:713-725.
186. Palomero T, Sulis ML, Cortina M, Real PJ, Barnes K, Ciofani M, et al. Mutational loss of PTEN induces resistance to NOTCH1 inhibition in T-cell leukemia. *Nat Med.* 2007; 13:1203-1210.
187. Parrish-Novak J, Dillon SR, Nelson A, et al. Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. *Nature* 2000; 408:57-63.
188. Passweg JR, Tichelli A, Meyer-Monard S, Heim D, Stern M, Kuhne T, et al. Purified donor NK-lymphocyte infusion to consolidate engraftment after haploidentical stem cell transplantation. *Leukemia* 2004; 18:1835-1838.
189. Paul S, Miguel IO, Julie M, *et al.* Cost and clinical analysis of autologous hematopoietic stem cell mobilization with G-CSF and plerixafor compared to G-CSF and cyclophosphamide. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2011; 17:729-736.
190. Perussia B, Ramoni C, Anegon I, Cuturi MC, Faust J, Trinchieri G. Preferential proliferation of natural killer cells among peripheral blood mononuclear cells cocultured with B lymphoblastoid cell lines. *Nat Immun Cell Growth Regul.* 1987; 6:171-188.

-
191. Petit I, Szyper-Kravitz M, Nagler A, Lahav M, Peled A, Habler L et al. G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nature Immunol* 2002; 3:687-694.
192. Phillips JH, Hori T, Nagler A, Bhat N, Spits H, Lanier LL. Ontogeny of human natural killer (NK) cells: fetal NK cells mediate cytolytic function and express cytoplasmic CD3 epsilon, delta proteins. *J Exp Med* 1992; 175:1055-1066.
193. Pittari G, Filippini P, Gentilcore G, Grivel JC, Rutella S. Revving up natural killer cells and cytokine-induced killer cells against hematological malignancies. *Front. Immunol.* 2015; 6:230.
194. Pui CH, Relling MV, Downing JR. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med.* 2004; 350:1535-1548.
195. Pyo CW, Guethlein L, Vu Q, Wang R, Abi-Rached L, Norman PJ, et al. Different patterns of evolution in the centromeric and telomeric regions of group A and B haplotypes of the human killer cell Ig-like receptor locus. *PLoS ONE* 2010; 5:e15115.
196. Rabin KR, Poplack DG. Management strategies in acute lymphoblastic leukemia. *Oncology (Williston Park)* 2011; 25:328-35.
197. Rabinowich H, Sedlmayr P, Herberman RB, Whiteside TL. Increased proliferation, lytic activity, and purity of human natural killer cells cocultured with mitogen-activated feeder cells. *Cell. Immunol.* 1991; 135:454-470.
198. Rey J, Veuillen C, Vey N, Bouabdallah R, Olive D. Natural killer and $\gamma\delta$ T cells in haematological malignancies: enhancing the immune effectors. *Trends in Molecular Medicine.* 2009; 15:275-284.
199. Rizzieri DA, Storms R, Chen DF, et al. Natural Killer cell-enriched donor lymphocyte infusions from A 3-6/6 HLA matched family member following nonmyeloablative

-
- allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2010; 16:1107-1114.
- 200.Roberts KG, Mullighan CG. Genomics in acute lymphoblastic leukaemia: Insights and treatment implications. *Nat Rev Clin Oncol.* 2015; 12:344-357.
- 201.Robertson MJ, Cameron C, Lazo S, Cochran KJ, Voss SD, Ritz J. Costimulation of human natural killer cell proliferation: role of accessory cytokines and cell contactdependent signals, *Nat. Immun.* 1996; 15:213-226.
- 202.Robinson BW, Morstyn G. Natural killer (NK)-resistant human lung cancer cells are lysed by recombinant interleukin-2-activated NK cells. *Cell. Immunol.* 1987; 106:215-222.
- 203.Roboz GJ. Current treatment of acute myeloid leukemia. *Curr Opin Oncol.* 2012; 24: 711-719.
- 204.Romagne F, Vivier E. Natural killer cell-based therapies. *F1000Med. Rep.* 2011;3: 9.
- 205.Romee R, Leong JW, Fehniger TA. Utilizing cytokines to function-enable human NK cells for the immunotherapy of cancer. *Scientifica (Cairo)* 2014; 2014:205796.
- 206.Rosenberg SA. Cancer immunotherapy comes of age. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* 2005; 2:115.
- 207.Rosenberg SA. Interleukin-2 and the development of immunotherapy for the treatment of patients with cancer. *Cancer J. Sci. Am.* 2000; 6 (Suppl. 1) S2-S7.
- 208.Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, Chang AE, Avis FP, Leitman S, et al. A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine- activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone. *N. Engl. J. Med.* 1987; 316: 889-897.
- 209.Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, Leitman S, Chang AE, Ettinghausen SE, et al. Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer

-
- cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N Engl J Med.* 1985; 313:1485-1492.
210. Rosenberg SA, Spiess P, Lafreniere R: A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. *Science.* 1986; 233:1318-1321.
211. Rosenberg SA, Yang JC, Sherry RM, Kammula US, Hughes MS, Phan GQ, Citrin DE, Restifo NP, Robbins PF, Wunderlich JR, et al. Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. *Clin Cancer Res.* 2011; 17:4550-4557.
212. Roychowdhury S, Blaser BW, Freud AG, Katz K, Bhatt D, Ferketich AK, et al. IL-15 but not IL-2 rapidly induces lethal xenogeneic graft-versus-host disease. *Blood* 2005; 106: 2433-2435.
213. Rubnitz JE, Inaba H, Ribeiro RC, Pounds S, Rooney B, Bell T, et al. NKAML: a pilot study to determine the safety and feasibility of haploidentical natural killer cell transplantation in childhood acute myeloid leukaemia. *J Clin Oncol.* 2010; 28:955-959.
214. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 2002; 295:2097-100.
215. Sangiolo D, Martinuzzi E, Todorovic M, Vitaggio K, Vallario A, Jordaney N, Carnevale-Schianca F, Capaldi A, Geuna M, Casorzo L, et al. Alloreactivity and anti-tumor activity segregate within two distinct subsets of cytokine-induced killer (CIK) cells: implications for their infusion across major HLA barriers. *Int Immunol.* 2008; 20:841-848.
216. San Miguel JF, Martinez A, Macedo A, Vidriales MB, Lopez-Berges C, Gonzalez M et al. Immunophenotyping investigation of minimal residual disease is a useful approach for predicting relapse in acute myeloid leukemia patients. *Blood* 1997; 90:2465-2470.

-
- 217.Schmidt-Wolf IG, Lefterova P, Mehta BA, Fernandez LP, Huhn D, Blume KG, Weissman IL, Negrin RS. Phenotypic characterization and identification of effector cells involved in tumor cell recognition of cytokine-induced killer cells. *Exp Hematol.* 1993; 21:1673-1679.
- 218.Schmidt-Wolf IG, Negrin RS, Kiem HP, Blume KG, Weissman IL. Use of a SCID mouse/human lymphoma model to evaluate cytokine-induced killer cells with potent antitumor cell activity. *J Exp Med.* 1991; 174:139-149.
- 219.Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* 1978; 4:7-25.
- 220.Schwartz SD, Hubschman JP, Heilwell G, Franco-Cardenas V, Pan CK, Ostrick RM, et al. Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report. *Lancet.* 2012; 379:713-720.
- 221.Seidel MG, Freissmuth M, Pehamberger H, Micksche M. Stimulation of natural killer activity in peripheral blood lymphocytes of healthy donors and melanoma patients in vitro: synergism between interleukin (IL)-12 and IL-15 or IL-12 and IL-2. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 1998; 358:382-389.
- 222.Shah N, Martin-Antonio B, Yang H, Ku S, Lee DA, Cooper LJ, et al. Antigen presenting cell-mediated expansion of human umbilical cord blood yields log-scale expansion of natural killer cells with anti-myeloma activity. *PLoS ONE* 2013; 8:0076781.
- 223.Shi J, Tricot G, Szmania S, Rosen N, Garg TK, Malaviarachchi PA, et al. Infusion of haploidentical killer immunoglobulin-like receptor ligand mismatched NK cells for relapsed myeloma in the setting of autologous stem cell transplantation. *Br. J. Haematol.* 2008; 143:641-653.

-
224. Shibuya A, Nagayoshi K, Nakamura K, Nakauchi H. Lymphokine requirement for the generation of natural killer cells from CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1995; 85:3538-3546.
225. Shih AH, Abdel-Wahab O, Patel JP, Levine RL. The role of mutations in epigenetic regulators in myeloid malignancies. *Nat Rev Cancer*. 2012; 12:599-612.
226. Shilling HG, McQueen KL, Cheng NW, Shizuru JA, Negrin RS, Parham P. Reconstitution of NK cell receptor repertoire following HLA-matched hematopoietic cell transplantation. *Blood* 2003; 101:3730-3740.
227. Shook DR, Campana D. Natural killer cell engineering for cellular therapy of cancer. *Tissue Antigens*. 2011; 78:409-415.
228. Siegler U, Kalberer CP, Nowbakht P, et al. Activated natural killer cells from patients with acute myeloid leukemia are cytotoxic against autologous leukemic blasts in NOD/SCID mice. *Leukemia* 2005; 19:2215-2222.
229. Siegler U, Meyer-Monard S, Jrger S, et al. Good manufacturing practice-compliant cell sorting and large-scale expansion of single KIR-positive alloreactive human natural killer cells for multiple infusions to leukemia patients. *Cytotherapy* 2010; 12:750-763.
230. Sivori S, Falco M, Marcenaro E, Parolini S, Biassoni R, Bottino C, et al. Early expression of triggering receptors and regulatory role of 2B4 in human natural killer cell precursors undergoing in vitro differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99:4526-4531.
231. Somanchi SS, Senyukov VV, Denman CJ, Lee DA. Expansion, purification, and functional assessment of human peripheral blood NK cells. *J. Vis. Exp.* (2011, doi: 10.3791/2540).

-
- 232.Spanholtz J, Preijers F, Tordoir M, et al. Clinical-grade generation of active NK cells from cord blood hematopoietic progenitor cells for immunotherapy using a closed-system culture process. *PLoS One*. 2011; 6:16.
- 233.Stahl T, Badbaran A, Kroger N et al. Minimal residual disease diagnostics in patients with acute myeloid leukemia in the post-transplant period: comparison of peripheral blood and bone marrow analysis. *Leuk. Lymphoma*. 2010; 51:1837-1843.
- 234.Stavropoulou V, Brault L, Schwaller J. Insights into molecular pathways for targeted therapeutics in acute leukaemia. *Swiss Med Wkly*. 2010; 140:w13068.
- 235.Stern M, Passweg JR, Meyer-Monard S, et al. Pre-emptive immunotherapy with purified natural killer cells after haploidentical SCT: a prospective phase II study in two centers. *Bone Marrow Transplant*. 2013; 48:433-438.
- 236.Stringaris K, Adams S, Uribe M, Eniafe R, Wu CO, Savani BN, et al. Donor KIRGenes 2DL5A, 2DS1 and 3DS1 are associated with a reduced rate of leukemia relapse after HLA-identical sibling stem cell transplantation for acute myeloid leukemia but not other hematologic malignancies. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010; 16:1257-1264.
- 237.Sulong S, Moorman AV, Irving JA, Strefford JC, Konn ZJ, Case MC, et al. A comprehensive analysis of the CDKN2A gene in childhood acute lymphoblastic leukemia reveals genomic deletion, copy number neutral loss of heterozygosity, and association with specific cytogenetic subgroups. *Blood* 2009; 113:100-107.
- 238.Surapaneni UR, Cortes JE, Thomas D, O'Brien S, Giles FJ, Koller C, et al. Central nervous system relapse in adults with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* 2002; 94: 773-779.
- 239.Sutlu T, Alici E. Natural killer cell-based immunotherapy in cancer: current insights and future prospects. *J. Intern. Med*. 2009; 266:154-181.

-
- 240.Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4th ed. Lyon: IARC; 2008.
- 241.Szmania S, Garg TK, Lapteva N, et al. Fresh ex vivo expanded natural killer cells demonstrate robust proliferation in vivo in high-risk relapsed multiple myeloma (MM) patients [abstract]. Blood (ASH Annual Meeting Abstracts). 2012; 120:579.
- 242.Tabe Y, Konopleva M. Advances in understanding the leukaemia microenvironment. Br. J. Haematol. 2014; 164:767-778.
- 243.Taga T, Kariya Y, Shimada M, et al. Suppression of natural killer cell activity by granulocytes in patients with aplastic anemia: role of granulocytes colony- stimulating factor. Immunol Lett. 1993; 39:65-70.
- 244.Tayebi H, Kuttler F, Saas P, et al. Effect of granulocyte colony-stimulating factor mobilization on phenotypical and functional properties of immune cells. Exp. Hematol. 2001; 29:458-470.
- 245.Themeli M, Kloss CC, Ciriello G, Fedorov VD, Perna F, Gonen M, et al. Generation of tumor-targeted human T lymphocytes from induced pluripotent stem cells for cancer therapy. Nat Biotechnol. 2013; 31:928-933.
- 246.Toh HC, Sun L, Soe Y, et al. G-CSF induces a potentially tolerant gene and immunophenotype profile in T cells *in vivo*. Clinical Immunology 2009; 132:83-92.
- 247.Torikai H, Reik A, Soldner F, Warren EH, Yuen C, Zhou Y, et al. Toward eliminating HLA class I expression to generate universal cells from allogeneic donors. Blood. 2013; 122:1341-1349.
- 248.Trzonkowski P, Zaucha JM, Mysliwska J, et al. Differences in kinetics of donor lymphoid cells in response to G-CSF administration may affect the incidence and severity of acute GvHD in respective HLA-identical sibling recipients. Med Oncol. 2004; 21:81-

94.

249. Tyler EM, Jungbluth AA, O'Reilly RJ, et al. WT1-specific T-cell responses in high-risk multiple myeloma patients undergoing allogeneic T cell-depleted hematopoietic stem cell transplantation and donor lymphocyte infusions. *Blood* 2013; 121:308-317.
250. Vacca P, Vitale C, Montaldo E, Conte R, Cantoni C, Fulcheri E, et al. CD34+ hematopoietic precursors are present in human decidua and differentiate into natural killer cells upon interaction with stromal cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011; 108: 2402-2407.
251. Vago L, Forno B, Sormani MP, Crocchiolo R, Zino E, Di Terlizzi S, et al. Temporal, quantitative, and functional characteristics of single-KIR-positive alloreactive natural killer cell recovery account for impaired graft-versus-leukemia activity after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2008; 112:3488-3499.
252. van der Most RG, Currie AJ, Mahendran S, Prosser A, Darabi A, Robinson BW, et al. Tumor eradication after cyclophosphamide depends on concurrent depletion of regulatory T cells: a role for cycling TNFR2-expressing effector-suppressor T cells in limiting effective chemotherapy. *Cancer Immunol Immunother*. 2009; 58:1219-1228.
253. Vellenga E, van Putten W, Ossenkoppele GJ, et al. Autologous peripheral blood stem cell transplantation for acute myeloid leukemia. *Blood* 2011; 118:6037-6042.
254. Venstrom JM, Pittari G, Gooley TA, Churning JH, Spellman S, Haagenson M, et al. HLA-C-dependent prevention of leukemia relapse by donor activating KIR2DS1. *N Engl J Med*. 2012; 367:805-816.
255. Vosshenrich CA, Ranson T, Samson SI, Corcuff E, Colucci F, Rosmaraki EE, et al. Roles for common cytokine receptor gamma-chain-dependent cytokines in the generation,

-
- differentiation, and maturation of NK cell precursors and peripheral NK cells in vivo. *J Immunol.* 2005; 174:1213-1221.
256. Waldmann TA. The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. *Nat. Rev. Immunol.* 2006; 6:595-601.
257. Wallin RPA, Screpanti V, Michaëlsson J, Grandien A, Ljunggren HG. Regulation of perforin-independent NK cell-mediated cytotoxicity. *Eur. J. Immunol.* 2003; 33:2727-2735.
258. Wang Y, Liu DH, Xu LP, et al. Prevention of relapse using granulocyte CSF-primed PBPCs following HLA-mismatched/haploidentical, T-cell-replete hematopoietic SCT in patients with advanced-stage acute leukemia: a retrospective risk-factor analysis. *Bone Marrow Transplantation.* 2012; 47:1099-1104.
259. Wang ZD, Dan L, Huang XJ. Graft-versus-leukemia effects of Wilms' tumor 1 protein-specific cytotoxic T lymphocytes in patients with chronic myeloid leukemia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Chin Med J.* 2010; 123:912-916.
260. Warren EH, Fujii N, Akatsuka Y, Chaney CN, Mito JK, Loeb KR, et al. Therapy of relapsed leukemia after allogeneic hematopoietic cell transplantation with T cells specific for minor histocompatibility antigens. *Blood* 2010; 115:3869-3878.
261. Weng AP, Ferrando AA, Lee W, Morris JP, Silverman LB, Sanchez-Irizarry C, et al. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science* 2004; 306:269-71.
262. Wilhelm M, Kunzmann V, Eckstein S, et al. $\gamma\delta$ T cells for immune therapy of patients with lymphoid malignancies. *Blood* 2003; 102:200-206.

-
263. Wilhelm M, Smetak M, Schaefer-Eckart K, Kimmel B, Birkmann J, Einsele H, et al. Successful adoptive transfer and in vivo expansion of haploidentical $\gamma\delta$ T cells. *Journal of Translational Medicine* 2014; 12:45.
264. Williams NS, Klem J, Puzanov IJ, Sivakumar PV, Schatzle JD, Bennett M, et al. Natural killer cell differentiation: insights from knockout and transgenic mouse models and in vitro systems. *Immunol Rev.* 1998; 165:47-61.
265. Woll PS, Grzywacz B, Tian X, et al. Human embryonic stem cells differentiate into a homogeneous population of natural killer cells with potent in vivo antitumor activity. *Blood* 2009; 113:6094-6101.
266. Yates JW, Wallace HJ Jr, Ellison RR, Holland JF. Cytosine arabinoside (NSC-63878) and daunorubicin (NSC-83142) therapy in acute nonlymphocytic leukemia. *Cancer Chemother Rep* 1973; 57:485-488.
267. Yoon SR, Kim TD, Choi I. Understanding of molecular mechanisms in natural killer cell therapy. *Exp. Mol. Med.* 2015; 47:e141.
268. Yoon SR, Lee YS, Yang SH, Ahn KH, Lee JH, Lee JH, et al. Generation of donor natural killer cells from CD34+ progenitor cells and subsequent infusion after HLA-mismatched allogeneic hematopoietic cell transplantation: a feasibility study. *Bone Marrow Transplant.* 2010; 45:1038-1046.
269. Yron I, Wood TA Jr, Spiess PJ, Rosenberg SA. In vitro growth of murine T cells. V. The isolation and growth of lymphoid cells infiltrating syngeneic solid tumors. *J Immunol.* 1980; 125:238-245.
270. Yu H, Fehniger TA, Fuchshuber P, Thiel KS, Vivier E, Carson WE, et al. Flt3 ligand promotes the generation of a distinct CD34(+) human natural killer cell progenitor that responds to interleukin-15. *Blood* 1998; 92:3647-3657.

-
271. Zeiser R, Spyridonidis A, Wasch R, Ihorst G, Grulich C, Bertz H, et al. Evaluation of immunomodulatory treatment based on conventional and lineage-specific analysis in patients with myeloid malignancies after myeloablative allogeneic haematopoietic cell transplantation. *Leukemia* 2005; 19:814-821.
272. Zhang H, Cui Y, Voong N, et al. Activating signals dominate inhibitory signals in CD137L/IL-15 activated natural killer cells. *J Immunother.* 2011; 34:187-195.
273. Zhong ZD, Luo Y, Zou P, et al. Infusions of recipient-derived cytokine-induced killer cells of donor origin eradicated residual disease in a relapsed leukemia patient after allo-hematopoietic stem cell transplantation. *Chinese Medical Journal.* 2012; 125:1669-1671.

Annexe

Impaired functions and proliferation of NK cells from patient granulocyte-colony stimulating factor mobilized leukapheresis

Yu Xiong^{1,2}, Loic Reppel^{1,3}, Cécile Pochon³, Jean-francois Stoltz^{1,3}, Danièle Bensoussan^{1,3},
Véronique Decot^{1,3}

¹Cell Therapy Department, University Hospital of Nancy, Vandoeuvre les Nancy, France;

²Institute of Hepatobiliary Diseases, Transplant Center, Hubei Key Laboratory of Medical Technology on Transplantation, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan, China;

³UMR CNRS UL 7365, Lorraine University, Vandoeuvre les Nancy, France

Objective. Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF)-mobilized peripheral blood stem cell (PBSC) collections are increasingly emerging as the graft of choice in many centers for autologous transplantation, and with increasing frequency in allogeneic transplantation. In an allogeneic setting, natural killer (NK) cells have a critical role in graft *versus* host disease and graft *versus* leukemia effects. However, the impact of G-CSF on NK cells response remains unclear. In this study, we compared NK cell phenotype and functions isolated from PBSC collections from both healthy donors and patients mobilized with G-CSF.

Materials and Methods. After informed consent, NK cells were isolated either from fresh blood sample, fresh PBSC transplant from allogeneic healthy donors or fresh patient's autologous PBSC transplant, using a CD3/CD19 depletion method and expanded for 14 days in the presence of 50 ng/mL interleukin (IL)-15. Expression of NKG2D, KIR2DL1, KIR2DL3, KIR2DL5, and CD137 was monitored by flow cytometry. NK cell cytotoxicity was evaluated at the end of culture and cytokine secretion was measured at day 7, 10 and 14. Results. Highly T- and B-cell depleted NK cells were obtained. The percentage of CD56^{bright}CD16⁺ NK cell was significantly lower in G-CSF mobilized PBSC from patients after expansion and proliferated less than NK cells from normal peripheral blood or G-CSF mobilized PBSC from normal donors. In contrast the percentage of CD56^{bright}CD16⁻ NK cells was significantly higher in G-CSF mobilized PBSC from patients after expansion. The expression of KIR2DL1, KIR2DL3, KIR2DL5 and CD137 was significantly different among the three origins of CD56^{bright}CD16⁺ NK cells and the expression of KIR2DL3, KIR2DL5 and CD137 was significantly different among the three origins of CD56^{bright}CD16⁻ NK cells. NK cells sorted from G-CSF mobilized PBSC from patients also exhibited a diminished ability to kill tumor targets. Whereas TNF and IFN γ were readily detected at day 0 in the cell culture supernatant of healthy donor cells, TNF and IFN γ production was progressively acquired by NK cells

from mobilized sources at the end of the cell culture suggesting a maturation process in vitro. Conclusion. The findings presented here show that G-CSF administration to patients decreases CD56^{bright}CD16⁺ NK cell population, proliferation and function. Overcoming this impairment in lymphoid capacity may be important to facilitate post-transplant immunotherapy.

Keywords: granulocyte-colony stimulating factor; natural killer cells; expansion; cytotoxicity; immunotherapy

Introduction

Primitive progenitors have been known to circulate in the peripheral blood (PB) of animals and man ^[1-3]. The development of commercially available growth factors such as (granulocyte-colony stimulating factor [G-CSF] and granulocyte macrophage-CSF [GM-CSF]) has dramatically changed the clinical practice of marrow transplantation by facilitating the mobilization of stem cells into the peripheral blood. The use of mobilized peripheral blood stem cell (PBSC) grafts is now routine for autologous transplantation. More recently, increased use of PBSC as a graft source for allogeneic transplantation is being reported ^[4]. The ease of donor stem cell collection and accelerated neutrophil engraftment after transplantation are among the major known advantages of this stem cell source. However, there are many questions that remain to be answered such as whether growth factor affects the phenotype or functionality of immune cells present in the stem cell transplant.

Natural killer (NK) cells are bone marrow (BM)-derived lymphocytes that recognize and kill virally infected cells and transformed malignant cells ^[5,6]. During allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), NK cells have been implicated in the suppression of graft-versus-host disease (GvHD), the promotion of BM engraftment, and mediation of a graft-versus-leukemia (GvL) effect ^[7]. It has been shown that NK cells are regulated by the balance between activating and inhibitory signals. Receptors mediating inhibitory signals are called inhibitory killer immunoglobulin (Ig)-like receptors (KIR), many of which are known to recognize human leukocyte antigen (HLA) class I molecules. In transplantations between HLA-non identical donors and recipients, recipient target cells lacking the appropriate HLA class I ligand are recognized by donor NK-cell inhibitory KIR ^[8]. Upon interaction with target cells, NK cells lower their activation threshold, particularly if target cells express additional

activating NK receptor ligands. Once activated, NK cells are then able to kill recipient leukemic cells. Other studies suggested that this can also occur in HLA-identical sibling transplantation [9,10]. These anti-leukemic effects lead to lower the rates of relapse, graft failure, or GvHD and to a higher overall survival in patients with myeloid leukemia.

Very few data has been published regarding the impact of G-CSF on NK cell functions. It was shown that G-CSF increased the alloAg-presenting capability of immune accessory cells [11,12]. However, other studies observed that G-CSF impaired NK cell functionality by decreasing their cytotoxicity [13]. Because of the controversy regarding NK cell activity in the setting of G-CSF-mobilized HSCT, clarification of the role of G-CSF in regulating NK cell activity is necessary. Therefore, the present study assayed the phenotype, functionality and expansion rate of NK cells isolated from the PB sample from healthy donors, fresh PBSC from allogeneic healthy donors and fresh autologous PBSC from patients. The results showed that a CD3/CD19 depletion is effective to obtain highly T- and B-cell-depleted NK cells. In our test, G-CSF administration to patient significantly decreased CD56^{bright}CD16⁺ NK cells population and increased CD56^{bright}CD16⁻ NK cells population; significantly modified KIR expressions; augmented TNF and IFN γ secretions and decreased cytolytic activity of NK cells.

Materials and methods

After informed consent, PB samples (150 mL) were obtained from healthy donors (HD), fresh PBSC transplants (3 mL) were obtained from allogeneic HD and fresh autologous PBSC transplants (3 mL) were obtained from patients. Each experiment was performed in triplicate.

NK-cell enrichment

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were separated from blood by sedimentation on a mononuclear cell separation medium (PAA Laboratories, Etobicoke, Canada). PBMC recovered from the interface were washed twice with 199 medium (15 minutes, 600g) and were resuspended in magnetic-activated cell sorting buffer and were counted using a hemocytometer.

The PBSC transplants were centrifuged 20 minutes, $\times 200g$ to remove platelets. PBSC were then resuspended in magnetic-activated cell sorting buffer and were counted using a hemocytometer.

The cell suspension was incubated with anti-CD3 and anti-CD19 magnetic particles for 15 minutes at $4^{\circ}C$ using $20 \mu L$ for 10^7 cells. At the end of the incubation, cells were washed once and passed through a LD magnetic-activated cell sorting separation column (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Unbound cells containing NK cells were washed out with three aliquots of 1 mL separation buffer. The positive fraction containing T and B cells was eluted with the separation buffer after removing the column from the magnetic field. T and B cells were used as feeder cells after 30 Gy irradiation.

Expansion of NK cells

Isolated NK cells ($5 \times 10^4/mL$) were suspended in X-vivo-15 media (Lonza, Walkersville, MD, USA) in presence of irradiated feeder cells ($5 \times 10^6/mL$), 10% fetal bovine serum (Gibco-Invitrogen, Paisley, UK), 2 mM glutamine (Eurobio, ourtaboeuf, France), 1 mg/mL streptomycin, 1 U/mL penicillin, 0.025 mg/mL amphotericin B, and 50 ng/mL IL-15 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) at $37^{\circ}C$, 5% CO_2 . The medium was changed every 2 to 4 days, and the concentration of the cells adjusted to $1 \times 10^6/mL$.

Total cell numbers were assessed after staining cells with Trypan blue dye (Sigma, St Louis, MO, USA) and counting them on a hemocytometer on days 7, 10, and 14. The absolute count

of each population was determined by using the following formula: Absolute count = % of specific subsets determined by flow cytometry × total number of cells.

Flow cytometry

Samples for flow cytometric analysis were taken after separation and every 7, 10 and 14 days during the cell culture. All incubations were performed at 4°C for 20 minutes with cells resuspended in phosphate-buffered saline containing 0.5% human serum albumin with 10 µL antibodies and cells were washed twice with phosphate- buffered saline after staining. Cells (1×10^5) were stained with anti-CD3 fluorescein isothiocyanates (FITC), anti-CD19 FITC, (from Beckman Coulter, Roissy, France), CD16-phycoerythrin, and CD56-allophycocyanin (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) to monitor the percentage of T cells, B cells, and NK cells. Phycoerythrin- conjugated anti-NKG2D, anti-KIR2DL1/DS1, anti-KIR2DL2/2DL3, anti-KIR2DL5, and anti-CD137 were obtained from Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany), IgG1-FITC and IgG1-PE isotype control were obtained from Becton Dickinson (Mountain View, CA, USA).

Samples were analyzed using FACScanto I (Becton Dickinson) and Diva analysis software (BD Biosciences, Franklin Lake, NJ, USA), setting appropriate forward scatter/side scatter. From the lymphocyte population, NK cells were gated as CD56^{bright}CD16⁻ and CD56^{bright}CD16⁺. Mean fluorescence intensity values for NKG2D, KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL5, and CD137 were determined on the CD56^{bright}CD16⁻ and CD56^{bright}CD16⁺ population after separation and every 7, 10 and 14 days of culture.

Cytotoxicity assay

Cytolytic activity of NK cells was tested in a 2-hour Europium (Eu) release assay after 14 days of culture. The K562 cell line (major histocompatibility complex class I-negative erythroleukemia cell line) was used as target. The K562 cell line was cultured in RPMI-1640

medium 20% fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 1 mg/mL streptomycin, 1 U/mL penicillin, 0.025 mg/mL amphotericin B at 37°C, 5% CO₂.

Target cells were incubated with a fluorescence enhancing ligand (BATDA, bis (acetoxymethyl) 2, 2':6' 2''-terpyridine- 6, 6''- dicarboxylate) for 20 minutes at 37°C and then washed fifth with complete medium. Target cells were placed in 96-well round-bottom plates with 5×10^4 cells per well. Effector cells were added after incubation to target cells at ratios 12.5:1, 6.25:1, 3.125:1, 1.5:1 in triplicate. After 2 hours incubation at 37°C, 5% CO₂, plates were centrifuged (200g, 5 minutes) and 20 µL supernatant removed from each well and added 200 µL of Europium Solution, incubated for 15 minutes at room temperature using the DELFIA Plateshake and measured the fluorescence in the time-resolved fluorometer (VICTOR, Perkin Elmer). The percentage of Eu release was calculated according to the following formula:

$$\% \text{ of specific lysis} = (\text{experimental release} - \text{spontaneous release}) / (\text{maximum release} - \text{spontaneous release}) \times 100.$$

Experimental release is the mean cpm release in the presence of effector cells; spontaneous release is the mean cpm spontaneously released by target cells incubated with medium alone and maximum release is the mean cpm release of target cells with 100 µL of cell culture medium supplemented with 10 µL of Lysis Buffer.

Cytometric bead array (CBA)

Supernatants for flow cytometric analysis were taken every 7, 10 and 14 days during the cell culture. They were harvested and stored at -20°C until cytokine analysis was performed. IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, TNF, and IFN γ were detected simultaneously using the human Th1/Th2/Th17 cytokine CBA kit (BD Biosciences, San Diego, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. Briefly, 50 µL of each sample was added to 50 µL of mixed

capture beads and 50 μ L of the human Th1/Th2/Th17 PE detection reagent. Samples were incubated at room temperature for 3 hours in the dark. After incubation, samples were washed once and resuspended in 300 μ L of wash buffer before acquisition with the FACSCanto.

Data were analyzed using FCAP Array software. Standard curves were generated for each cytokine using the mixed cytokine standard provided with the kit. The concentration for each cytokine in cell supernatants was determined by interpolation from the corresponding standard curve. The range of detection was 20-5000 pg/mL for each cytokine measured by CBA.

Statistical analysis

Results are shown as mean \pm SEM. Statistical analysis was performed using Student's paired *t* test. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

Results

Kinetics of CD56^{bright}CD16⁻ and CD56^{bright}CD16⁺ NK cells during culture

To evaluate whether G-CSF could influence NK cells phenotype during 14 days expansion in presence of IL-15, a flow cytometric analysis was performed at different time points on NK cells isolated from (HD) blood, HD PBSC or patient PBSC. A modification of the NK cell subset repartition was observed during expansion depending on the NK cell source. Regarding the CD56^{dim} NK cell subset, the highest percentage of this subset was found at Day 0 in HD peripheral blood reaching 25%. A mean percentage of 4% and 2% of CD56^{dim} NK cells was found in HD PBSC and patient PBSC respectively. A decrease of this subset was observed all along the expansion time whatever the NK cell source. However a mean of 7% of CD56^{dim}

remained at day 14 for HD blood NK cells whereas this subset nearly disappears at the end of the culture time for HD or patients PBSC isolated NK cells (Fig. 1A).

Regarding the CD56^{bright} subset, an expansion of this subset was observed at the end of the culture time whatever the NK cell source, reaching 83%, 91% and 92% of NK cells for HD blood, HD PBSC and patient PBSC respectively. We next focused our analysis on the CD16 expression by this subset since we observed a difference in the CD56^{bright}CD16⁺ or CD16⁻ repartition between each NK cell source. The phenotypic characterization of NK cells from patient PBSC revealed a significant development of a CD56^{bright}CD16⁻ NK cell subset which reached 64% ± 7.4% of the total NK cell population at the end of the culture. This phenomenon was also observed to a lesser extent in NK cells from HD PBSC and HD blood but reached only 26% ± 8.5% and 15% ± 5.5% of the total NK cell population respectively (Fig. 1B). Regarding the CD56^{bright}CD16⁺ population, a marked difference was observed between HD blood and the G-CSF mobilized sources. A significant decrease of CD16 expression was observed between NK cells for HD blood and NK from patients PBSC (74% ± 3.4% *versus* 28% ± 5.1%) and between NK cells from HD PBSC and patients PBSC (64% ± 5.5% *versus* 28% ± 5.1%) (Fig. 1C).

When looking at the CD56^{bright}CD16⁻ NK cell kinetic of expansion, median fold expansion after 14 days was 83.6 fold for HD blood cells whereas NK cells isolated from HD PBSC and NK cells isolated from patients PBSC expand 10.5 and 12.4 fold respectively (Fig. 1D). CD56^{bright}CD16⁺ NK cells expanded the same way, with a 67.3, 12.3 and 9.6 fold expansion observed for HD blood cells, NK cells isolated from HD PBSC and patients respectively (Fig. 1E). The maximum NK cell expansion was observed from HD blood, however, the difference in term of expansion did not reach significance between each source.

Analysis of NK cell receptor expression

To phenotypically characterize the three different sources of NK cells, a detailed flow cytometric analysis was performed at day 0, 7, 10 and day 14. For each receptor analyzed, i.e., NKG2D, KIR2DL1, KIR2DL3, KIR2DL5, and CD137, mean fluorescent intensity values on receptor-positive subsets of NK cells were taken into account.

The figure 2A shows the expression of the receptors on CD56^{bright}CD16⁻ NK cells. Regarding the G-CSF mobilized sources, the 3 KIR receptors studied increased between day 0 and day 10 and then reached a plateau between day 10 and day 14. The maximal KIR expression was reached earlier at day 7 for HD blood NK cells. Noticeably, we observed a significantly increased expression of KIR2DL3 on patient PBSCs compared with HD PBSCs on day 7.

The maximal expression of NKG2D was seen at day 0, day 7 and day 10 on HD blood cells, patient PBSC and HD PBSCs, respectively. Regarding CD137 expression, it was clearly detected at Day 7 for HD blood cells but was not modified on NK cells from G-CSF mobilized sources all along the culture time. The figure 2B shows the receptor expression on CD56^{bright}CD16⁺ NK cells regarding the different sources. Interestingly, KIR2DL1 was significantly increased on HD blood compared to the G-CSF mobilized sources at day 0. Although KIR2DL1 expression remains stable all along the culture time on cells from mobilized patients or HD, a regular increase of its expression was observed on mobilized HD. NKG2D maximal expression on CD56^{bright}CD16⁺ NK cell was seen at day 10 on HD blood cells and HD PBSC but at day 7 on patient PBSC.

KIR2DL3 shows a similar expression pattern as for KIR2DL1 all along the culture time on HD cells. However, we observed a significant decrease of its expression between Day 0 and day 7 on NK cells from HD PBSCs compared to HD. An increase of KIR2DL3 was seen between Day 7 and Day 14 on the G-CSF mobilized sources.

For 2DL5, similarly to KIR2DL3 and KIR 2DL1, a stable expression of this receptor was observed on HD cells between Day 0 and Day 14. Its expression on NK cells from G-CSF mobilized sources remains below the expression level observed on HD cells but increases regularly until day 14 where it reaches the expression level observed on HD cells. Regarding CD137, its expression was significantly higher on HD cells at day 0, day 7 and Day 10 than on G-CSF mobilized sources. In contrast to the KIR receptors, a very weak increase of its expression was detected all along the culture time.

Taken together, these results showed that the KIR receptors studied were up regulated after 14 days of culture as compared to their basal expression on CD56^{bright}CD16⁻ NK cells whatever the cell source. Nevertheless, their expression profile was different on CD56^{bright}CD16⁺ cells depending on the NK cell source. Their expression remains stable on HD donor cells but increase on the G-CSF mobilized sources.

NK cells cytotoxicity

We next tested the cytotoxicity of three different NK cells sources against the K562 cell line after 14 days of culture at 3 different ratios. A high cytotoxicity was observed against K562 cells regarding NK cells from HD donors, mobilized or not. NK cells from patients PBSC exhibited a diminished ability to kill tumor targets even after 14 days of culture in presence of IL-15 (Fig. 3A).

Cytokine production

In addition to their cytotoxic capacity, NK cells are able to produce a variety of soluble factors. In order to evaluate the impact of G-CSF mobilization on NK cell functionality, we performed a CBA assay to determine the cytokine release in the cell culture supernatants at Day 7, 10 and 14. Our array experiments confirmed the preferential production of TNF and IFN γ by NK cells from PB, which has been reported previously ^[14] although we observed a

decrease of the cytokine production between day 7 and day 14. The TNF and IFN γ production by NK cells from HD and patients PBSC was significantly increased between Day 7 and 14. IL-6, IL-10 and IL-17A were mainly detected in HD NK cell culture reaching values above the sensitivity levels (20 pg/mL) at Day 7 but were neither detected at Day 14. Regarding the same cytokine secretion in NK cell supernatant from G-CSF mobilized sources, no detectable concentrations were obtained at day 14. IL-6 was decreased in supernatants from day 14 cells compared with day 7 cells. Other cytokines, which can concomitantly be detected by the CBA (IL-2, IL-4, IL-10, and IL-17A) remained below. These data suggest that cytokine production patterns of NK cells isolated from PB are not markedly altered after expansion.

Discussion

The ability of G-CSF to mobilize progenitors has been demonstrated and is well established in clinical transplantation ^[15,16]. Although much is known about myeloid function between stem cell sources, the lymphoid capacity between stem cell sources and its relevance is less well explored.

In this study, we evaluated whether CD56^{bright}CD16⁻ and CD56^{bright}CD16⁺ NK cells isolated from PB and G-CSF mobilized cells are equivalent in term of expansion, phenotype, cytotoxicity and cytokine secretion. Our results showed that maximal expansion of NK cells was obtained from PB compared with mobilized cells. The percentage of CD56^{bright}CD16⁺ NK cells from PB was significant greater than that of G-CSF administrated patients at the end of culture. This suggests that the growth factor would have an adverse impact on the ability of NK cells expansion. Immunomodulatory effects associated with G-CSF used for progenitor cell mobilization have been described in a number of studies ^[17-19]. While results vary

between studies, the influence of rhG-CSF has been reported on monocytes^[17], T cells^[18] and NK cells^[19,20]. There are contradictory reports on changes in the absolute numbers of NK cells and their proportion within total lymphocytes, following G-CSF administration^[21,22], functional assays produced equally contradictory results^[22]. There is no evidence that NK cells express the G-CSF receptor. In addition, no effect of G-CSF has been documented in a variety of *ex vivo* assays, using either selected or unselected NK cells^[20]; the latter observation suggests that other accessory mononuclear cells do not mediate an indirect effect that would change NK cell functions. Several groups^[20-22] already demonstrated that rhG-CSF administration *ex vivo* had no effect on the expression of CD2, CD7, CD8, CD16, CD25, CD94, CD161 and NK B1 receptors on PB NK cells. There was only one report that suggested a down-modulation of CD56 cell surface density, on both CD56^{bright}CD3⁻ cells and CD56^{dim}CD3⁻ cells^[23]. No report has provided an extensive evaluation of functionally important NK cell receptors. Our study is primarily interested in the KIR receptors, but the limit is that the antibodies available currently can not distinguish the activating and the inhibitory receptors, as they have the same extracellular structure.

We then analyzed whether physiological status (healthy donors *versus* patients) influenced the expansion capacity of NK cells or not. Our results showed that NK cells from G-CSF mobilized cells have the similar expansion capacity. However, NK cells from G-CSF mobilized HD have a significantly higher percentage in the CD56^{bright}CD16⁺ NK cell population and a significantly lower percentage in the CD56^{bright}CD16⁻ NK cell population compared with NK cells from G-CSF mobilized patients. This suggests that the disease would have an impact on NK cells expansion and mature abilities.

Then we evaluated the impact of status physiologic on NK cells phenotype, we observed a significant increase of KIR2DL3 and KIR2DL5 expressions on CD56^{bright}CD16⁻ NK cell from

G-CSF mobilized patients compared with G-CSF mobilized HD on day 7, a significant increase of KIR2DL3 expression on CD56^{bright}CD16⁺ NK cell from G-CSF mobilized patients compared with PB from HD on day 10, and a significant decrease of KIR2DL5 expression on CD56^{bright}CD16⁺ NK cell from G-CSF mobilized patients compared with PB from HD on day 0. We also observed that the expression of CD137, a member of the TNF receptor family, was changed on CD56^{bright}CD16⁻ NK cell from PB from HD compared with G-CSF mobilized HD on day 0, and was changed on CD56^{bright}CD16⁺ NK cell on day 7 and on day 14 compared with PB and G-CSF mobilized healthy donors, and on day 0 compared with PB and G-CSF mobilized patients. The engagement of CD137 by CD137L on activated T cells by antigen promotes their proliferation, their functions and survival. Its role in human NK cells appears to be different depending on the species. In mice, the engagement enhances their proliferation, secretion of IFN- γ , but not cytotoxicity. In humans, Baseeler *et al* published a study which compared the CD137 expression on cells from healthy donors and acute myeloid leukemia (AML) patients ^[24]. This study showed that CD137 is predominantly expressed on healthy activated cells but not resting cells. A lower expression of CD137 was also found on NK cells of leukemia patients. Our study showed that there is a significant lower expression of CD137 on CD56^{bright}CD16⁺ NK cell from G-CSF mobilized patients.

Beziat *et al.* demonstrated that CD56^{bright}CD16⁺ NK cells were an intermediate stage of NK cell maturation and CD56^{bright}CD16⁺ NK cells were fully able to kill target cells ^[25]. In our studies, the analysis of different sources of cells allowed us to observe the cells of patients appears to be less cytotoxic than cells from PB or G-CSF mobilized HD, this may due to the significantly lower percentage in the CD56^{bright}CD16⁺ NK cell population in G-CSF mobilized patients and a significant KIR expression. However, because of the small number of samples, we were unable to obtain significant differences. These results suggest that the status

physiologic of NK cells affect their function but need to be confirmed by a large number of experiments.

The capacities to produce proinflammatory cytokines and to kill NK-sensitive targets are important characteristics of activated NK cells. Previous studies documented the ability of NK cells from AML patients to produce IFN- γ and TNF- α after activation and to efficiently kill K562 cells [26]. We assessed the cytokines production by NK cells isolated from PB, PBSC from HD or patients and observed that the production of TNF and IFN γ was significantly increased by NK cells from PBSC from patients after 14 days culture, this may due to the significantly higher percentage of CD56^{bright}CD16⁻ NK cells. However, the killing of K562 tumors provides an argument that the NK cell population from PBSC from patients is functionally immature.

In summary, PB from healthy donors was the optimal source for NK cells expansion and NK cells from PB or PBSC from HD were equivalent in term of cytotoxicity. G-CSF administration to patients decreases CD56^{bright}CD16⁺ NK population and function. Overcoming this impairment in lymphoid capacity may be important to facilitate post-transplant immunotherapy. Furthermore, we observed an upregulation of most of the five receptors after 14 days of culture, and the expression of KIR2DL1, KIR2DL3, KIR2DL5 and CD137 was significantly different among the three origins of NK cells. This work will complement the operations performed to obtain a statistically significant number of samples and will be followed by evaluating NK cells cytotoxicity on leukemic blasts which expressed HLA surfaces are known.

Acknowledgments

This study was supported by an Oversea Study Fellowship from the China Scholarship Council, [<http://www.csc.edu.cn/>], No. 201308420488 and the Ligue contre le cancer Grand Est. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Conflict of Interest Statement

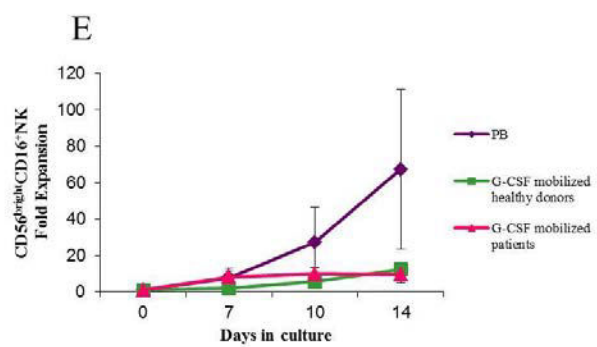
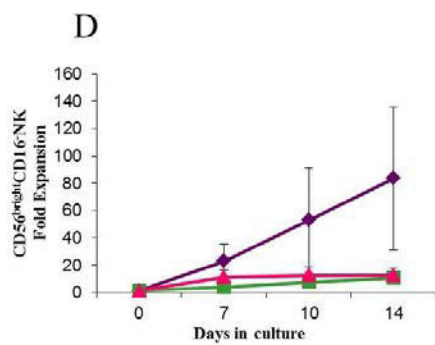
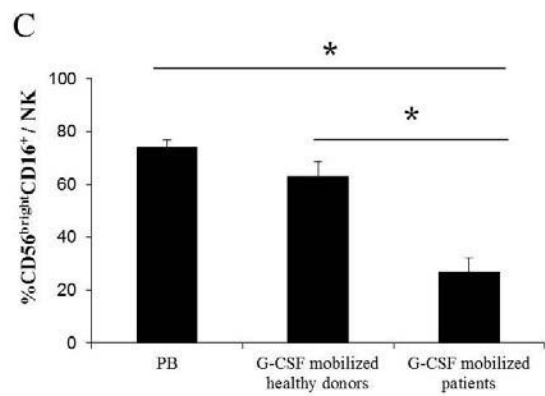
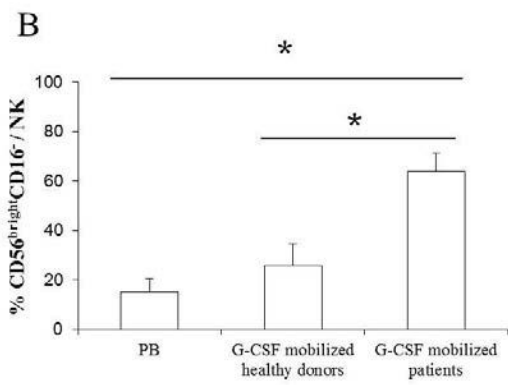
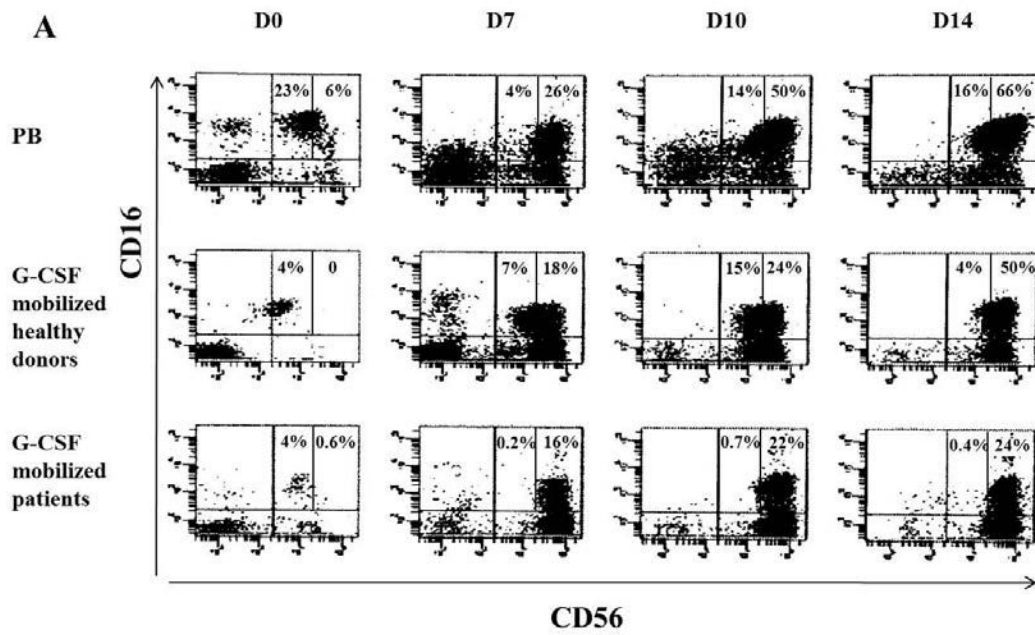
The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

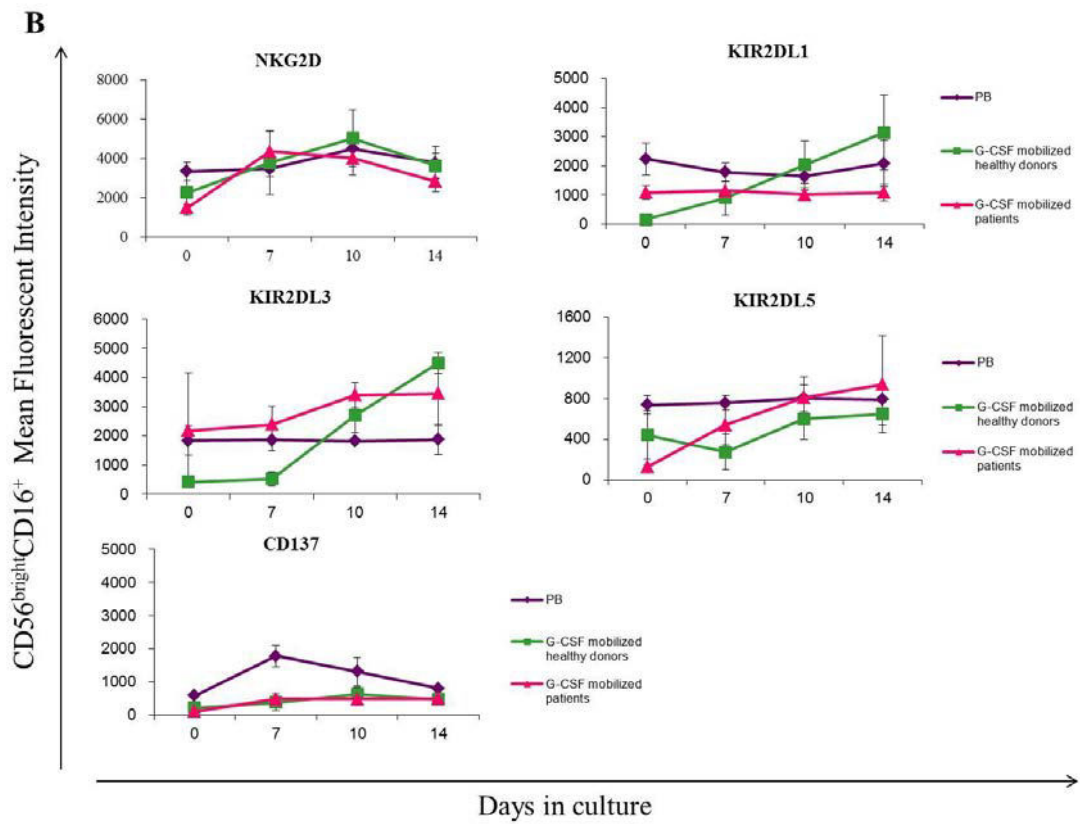
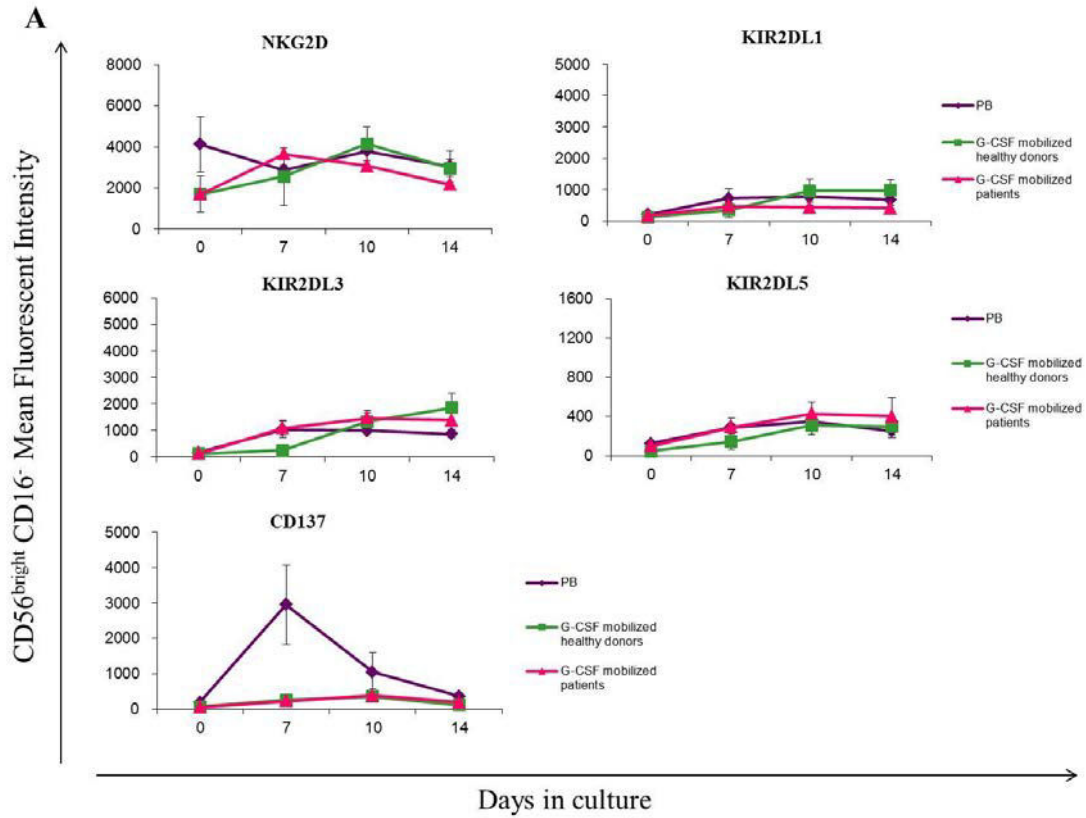
Figure legends

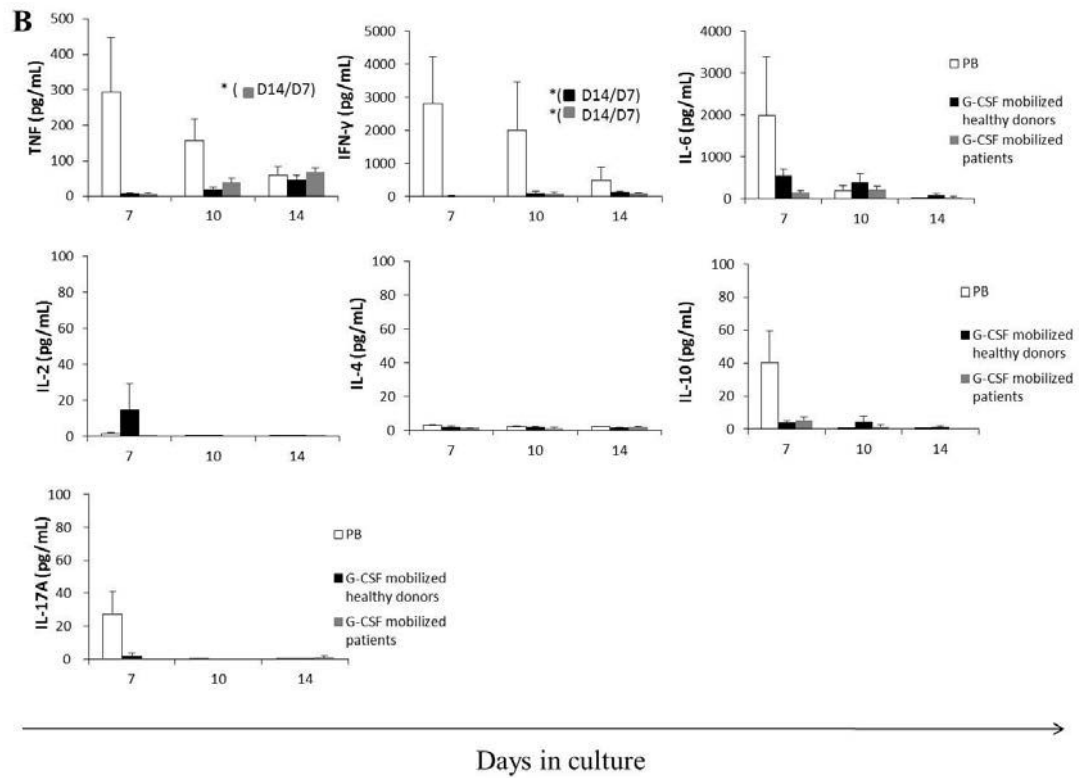
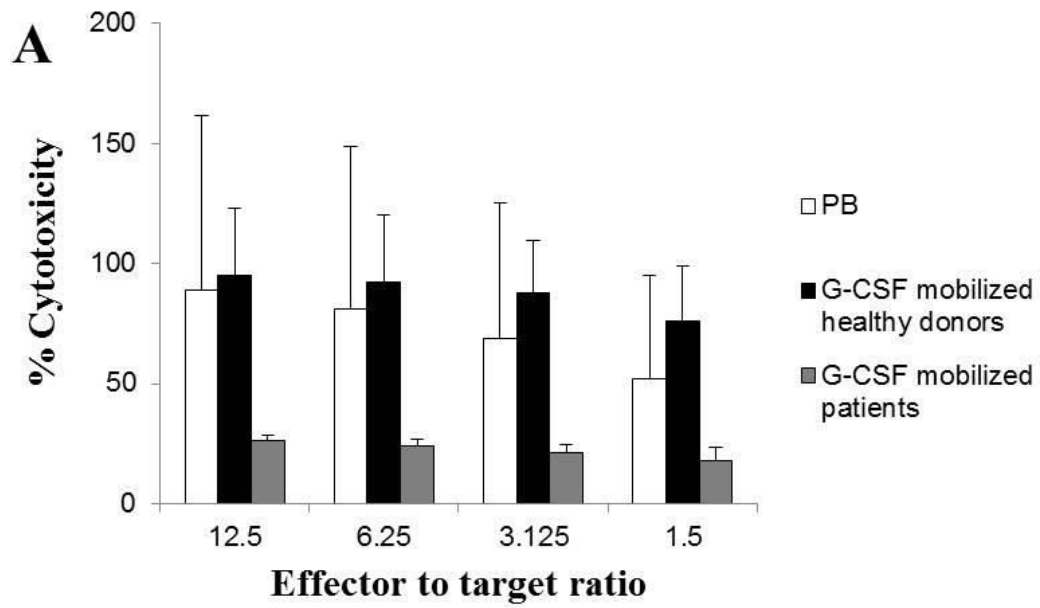
Figure 1. Representative dot plots gated on CD56^{bright} and CD56^{dim} NK cells from different origins on day 0 (D0), 7 (D7), 10 (D10), and 14 (D14) during culture (A). Frequency of CD56^{bright}CD16⁻ and CD56^{bright}CD16⁺ among NK cells during culture. CD56^{bright}CD16⁻ (B) or CD56^{bright}CD16⁺ (C) frequencies among NK cells after 14 days of culture compared with peripheral blood (PB) and granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) mobilized healthy donors or patients. Expansion dynamics of CD56^{bright}CD16⁻ (D) or CD56^{bright}CD16⁺ (E) NK cells from different origins for 14 days of culture. NK cells were isolated from 150 mL fresh PB sample from healthy donors, 3 mL of G-CSF-mobilized peripheral blood stem cell (PBSC) transplant from allogeneic healthy donors and 3 mL of G-CSF mobilized fresh autologous PBSC transplant from patients (n=3). Results are shown as mean \pm SEM. Comparison between groups was performed using *t* tests. **p*<0.05.

Figure 2. Changes in the NKG2D, KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL5 and CD137 receptor expression patterns on CD56^{bright}CD16⁻ (A) or CD56^{bright}CD16⁺ (B) NK cells for 14 days of culture.

Figure 3. Functional assays. Percentage of NK cells cytotoxicity from different origins after 14 days of culture (A). Cytokine secretion profile of NK cells from different origins on day 7, 10 and 14 during the cell culture (B). Results are shown as mean \pm SEM. Comparison between groups was performed using *t* tests. **p*<0.05.







References

1. Takehisa K, Chihiro S, Eishi A, *et al.* Mobilization of hematopoietic primitive and committed progenitor cells in to blood in mice by anti-vascular adhesion molecule-1 antibody alone or in combination with granulocyte colony- stimulating factor. *Exp. Hematol.* 2000; 28: 311-317.
2. Plett PA, Abonour R, Frankovitz SM, *et al.* Impact of modeled microgravity on migration, differentiation, and cell cycle control of primitive human hematopoietic progenitor cells. *Exp. Hematol.* 2004; 32: 773-781.
3. Hector M, J.Antonio AM, Patricia FG. Biology of human hematopoietic stem and progenitor cells present in circulation. *Archives of Medical Research.* 2003; 34: 476-488.
4. Karakukcu M, Unal E. Stem cell mobilization and collection from pediatric patients and healthy children. *Transfus Apher Sci.* 2015; 53: 17-22.
5. Zhao L, Bhamini P, Jian Z, *et al.* β 2-Microglobulin-free HLA-G activates natural killer cells by increasing cytotoxicity and proinflammatory cytokine production. *Human Immunology.* 2013; 74: 417-424.
6. Lin A, Xu HH, Xu DP, *et al.* Multiple steps of HLA-G in ovarian metastasis: Alter NK cytotoxicity and induce matrix metalloproteinase-15 (MMP-15) expression. *Human Immunology.* 2013; 74: 439-446.
7. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, *et al.* Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science.* 2002; 295: 2097-2100.
8. Velardi A. Role of KIRs and KIR ligands in hematopoietic transplantation. *Curr Opin Immunol.* 2008; 20: 581-587.

-
9. Hsu KC, Keever-Taylor CA, Wilton A, *et al.* Improved outcome in HLA-identical sibling hematopoietic stem-cell transplantation for acute myelogenous leukemia predicted by KIR and HLA genotypes. *Blood*. 2005; 105: 4878-4884.
 10. Verheyden S, Schots R, Duquet W, *et al.* A defined donor activating natural killer cell receptor genotype protects against leukemic relapse after related HLA-identical hematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia*. 2005; 19: 1446-1451.
 11. Chen YJ, Yu CC, Chen ST, *et al.* Functional regulation and proteomic characterization of human natural killer cells through recombinant human granulocyte-colony stimulating factor treatment. *Proteomics Clin Appl*. 2009; 3: 563-573.
 12. Rondelli D, Raspodiri D, Anasetti C, *et al.* Alloantigen presenting capacity, T cell alloreactivity and NK function of G-CSF-mobilized peripheral blood cells. *Bone Marrow Transplant*. 1998; 22: 631-637.
 13. Su YC, Li SC, Hsu CK, *et al.* G-CSF downregulates natural killer cell-mediated cytotoxicity in donors for hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplantation*. 2012; 47: 73-81.
 14. Berg M, Lundqvist A, McCoy Jr P, *et al.* Clinical grade ex vivo-expanded human natural killer cells upregulate activating receptors and death receptor ligands and have enhanced cytolytic activity against tumor cells. *Cytotherapy*. 2009; 11: 341-355.
 15. Katarzyna BK, Anna G, Katarzyna G, *et al.* Genetic variant of the G-CSF receptor gene is associated with lower mobilization potential and slower recovery of granulocytes after transplantation of autologous peripheral blood progenitor cells. *Cytokine*. 2012; 60: 463-467.

-
16. Paul S, Miguel IO, Julie M, *et al.* Cost and clinical analysis of autologous hematopoietic stem cell mobilization with G-CSF and plerixafor compared to G-CSF and cyclophosphamide. *Biology of Blood and Marrow Transplantation.* 2011; 17: 729-736.
 17. Masahiro S, Nobutaka K, Tomoko T, *et al.* Granulocyte colony-stimulating factor directly affects human monocytes and modulates cytokine secretion. *Exp. Hematol.* 2002; 30: 1115-1123.
 18. Toh HC, Sun L, Soe Y, *et al.* G-CSF induces a potentially tolerant gene and immunophenotype profile in T cells *in vivo*. *Clinical Immunology.* 2009; 132: 83-92.
 19. Lindemann M, Rebmann V, Ottinger HD, *et al.* rhG-CSF effect on mixed lymphocyte cultures and circulating soluble HLA antigen levels in volunteer stem cell donors. *Exp. Hematol.* 2004; 32: 1103-1109.
 20. Miller JS, Prosper F, McCullar V. Natural killer (NK) cells are functionally abnormal and NK cell progenitors are diminished in granulocyte colony- stimulating factor-mobilized peripheral blood progenitor cell collections. *Blood.* 1997; 90: 3098-3105.
 21. Tayebi H, Kuttler F, Saas P, *et al.* Effect of granulocyte colony-stimulating factor mobilization on phenotypical and functional properties of immune cells. *Exp. Hematol.* 2001; 29: 458-470.
 22. Trzonkowski P, Zaucha JM, Mysliwska J, *et al.* Differences in kinetics of donor lymphoid cells in response to G-CSF administration may affect the incidence and severity of acute GvHD in respective HLA-identical sibling recipients. *Med Oncol.* 2004; 21: 81-94.
 23. Taga T, Kariya Y, Shimada M, *et al.* Suppression of natural killer cell activity by granulocytes in patients with aplastic anemia: role of granulocytes colony- stimulating factor. *Immunol Lett.* 1993; 39: 65-70.

-
24. Baessler T, Charton JE, Schimiedel BJ, *et al.* CD137 ligand mediates opposite effects in human and mouse NK cells and impairs NK-cell reactivity against human acute myeloid leukemia cells. *Blood*. 2010; 115: 3058-3069.
25. Beziat V, Duffy D, Quoc SN, *et al.* CD56^{bright}CD16⁺ NK cells: a functional intermediate stage of NK cell differentiation. *The journal of immunology*. 2011; 186: 6753-6761.
26. Siegler U, Kalberer CP, Nowbakht P, *et al.* Activated natural killer cells from patients with acute myeloid leukemia are cytotoxic against autologous leukemic blasts in NOD/SCID mice. *Leukemia*. 2005; 19: 2215-2222.



Adoptive Immunotherapies After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Patients With Hematologic Malignancies



Yu Xiong^{a,c}, Danièle Bensoussan^{a,b}, Véronique Decot^{a,b,*}

^a Unité de Thérapie Cellulaire et Tissus, CHU Nancy, Nancy, France

^b Nancy Université, UL-UMR CNRS 7365, Faculté de Médecine, Vandoeuvre-lès-Nancy, Nancy, France

^c Institute of Hepatobiliary Diseases of Wuhan University, Transplant Center of Wuhan University, Hubei Key Laboratory of Medical Technology on Transplantation, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan, China

ARTICLE INFO

Available online 10 July 2015

Keywords:

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation
relapse
graft-versus-host disease
adoptive immunotherapies

ABSTRACT

Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is the only curative therapy for patients with chemotherapy-resistant hematologic malignancies that are usually fatal in absence of treatment. Hematopoietic stem cell transplantation is associated with significant early and late morbidity and mortality. Graft-versus-host disease, infections, and relapse are the most important causes of mortality after HSCT. Until now, these complications have been managed mainly with pharmacological drugs, but in some situations, this approach clearly shows its limit. As such, there is a significant need for novel therapies for the treatment of complications after allogeneic HSCT. In this review, the currently available adoptive immunotherapies offering an alternative in case of treatment failure of HSCT complications will be described. The results of the main clinical trials based on immune cell infusion will be discussed and the strategies aiming at maximizing cytotoxic T-lymphocyte, regulatory T-cell, natural killer cell, cytokine-induced killer cell, and $\gamma\delta$ T-cell efficacies in the context of immunotherapy approaches after allogeneic HSCT in patients with hematologic malignancies will be gathered.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

Contents

Graft-Versus-Host Disease	260
Role of Tregs in Human GVHD	260
Regulatory T Cells in Clinical Trials	261
Relapse	261
Donor Lymphocyte Infusion	261
Tumor-Specific CTLs	261
Minor Histocompatibility Antigen-Specific CTLs	261
Tumor-Associated Antigen-Specific CTLs	262
$\gamma\delta$ T Cells	262
Cytokine-Induced Killer Cells	263
Natural Killer Cells	264
Cross-Talk Between Tregs and NK Cells After HSCT	264
Conclusion and Future Directions	265
Conflict of Interest	265
Acknowledgments	265
References	265

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) is a potentially curative strategy for hematologic malignancies [1], solid

malignancies [2], and other nonmalignant diseases [3]. Early and late complications after allo-HSCT include graft-versus-host disease (GVHD), disease relapse, and infections [4]. These complications limit the efficacy of hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), and its outcome depends on numerous variables, such as the type of disease, age of the patient, stage of disease progression, and therapies used.

* Corresponding author at: Véronique Decot, PhD, Cell Therapy and Tissue Unit, CHU Nancy, Allée du Morvan, Vandoeuvre les Nancy, France, 54511.

E-mail address: v.decot@chu-nancy.fr (V. Decot).

Importantly, graft-versus-tumor (GVT) effects or recognition of cancer cells by donor T cells is the primary objective sought with this therapy. Unfortunately, GVHD and GVT are tightly associated, and the pathways of one can lead to the other. Therefore, novel methods of augmenting the GVT and treatments of complications after allo-HSCT are needed. This review will focus especially on current adoptive immunotherapeutic approaches (eg, cytotoxic T lymphocytes [CTLs], $\gamma\delta$ T cells, cytokine-induced killer [CIK] cells, natural killer [NK] cells, and regulatory T cells [Tregs]) developed to treat the complications occurring after allo-HSCT in patients with hematologic malignancies (Fig 1).

Graft-Versus-Host Disease

Graft-versus-host disease is primarily a donor T cell-mediated syndrome whereby T cells in the graft elicit an immune response, resulting in host tissue damage [5]. Hematopoietic stem cell transplantation recipients typically receive conditioning regimens consisting of chemotherapy and/or radiation to eliminate their underlying malignancy and facilitate the engraftment of allogeneic stem cells. However, the conditioning regimen can cause damage to host tissues, triggering the release of proinflammatory cytokines and activating the innate immune system, including host antigen-presenting cells [6]. Donor T cells in the graft interact with activated host antigen-presenting cells, recognize presented host peptides as foreign, and differentiate into cytokine-producing T effector cells. The ensuing proinflammatory cytokine storm recruits other effector cells, such as NK cells and macrophages. This perpetuates the proinflammatory cytokine cascade that is a hallmark of acute GVHD (aGVHD) and results in direct tissue damage, generally to a restricted set of organs (eg, skin, liver, and gastrointestinal tract) [7]. A second phase of GVHD, known as chronic GVHD (cGVHD), tends to have a more delayed presentation in patients, broader organ involvement, and clinical features that bear strong resemblance to autoimmune disorders [8]. Both aGVHD and cGVHD can be characterized as resulting from an imbalance between the effector and regulatory arms of the immune system [9]. Clinical approaches that restore

effective immune regulation are, therefore, an attractive treatment strategy for GVHD.

Regulatory T cells are characterized by the coexpression of CD4, high levels of surface CD25, and a master switch transcription factor called forkhead box P3 (Foxp3) that suppresses autoreactive lymphocytes and control innate and adaptive immune responses [10]. As they suppress exuberant immune system activation and promote immunologic tolerance, they have been a focal point of research studies designed to mitigate the severity of GVHD in early-stage clinical trials.

Role of Tregs in Human GVHD

Conflicting results have been published about the role of Tregs in GVHD. Magenau et al [11] showed that aGVHD was associated with a decrease of Tregs frequency in the peripheral blood of allo-HSCT recipients; moreover, several reports demonstrated a decreased frequency of Tregs in the peripheral blood of patients with high clinical grades of aGVHD as compared to patients with lower grade aGVHD [12,13]. Similar results have also been observed in cGVHD, where the frequency of Tregs negatively correlated with disease severity [12,14]. However, not all studies have demonstrated a correlation between reduced Tregs frequency and GVHD severity. Schneider et al [15] observed that cGVHD patients had increased numbers of peripheral blood CD4⁺CD25⁺ Tregs as compared to individuals without cGVHD. This was supported by 2 more recent studies that reported increased peripheral Tregs numbers in transplant recipients that developed cGVHD compared with those with no GVHD [16,17].

The reason for the differences observed in these studies is not entirely clear. For the most part, however, studies have failed to demonstrate that the Tregs frequency and/or absolute numbers predict the occurrence of GVHD; potential reasons include (a) sampling of a nonrepresentative compartment (peripheral blood may not reflect gut/skin populations) or (b) inadequate sensitivity with current techniques to discriminate host antigen-specific T cells/Tregs, where potentially larger differences might be observed.

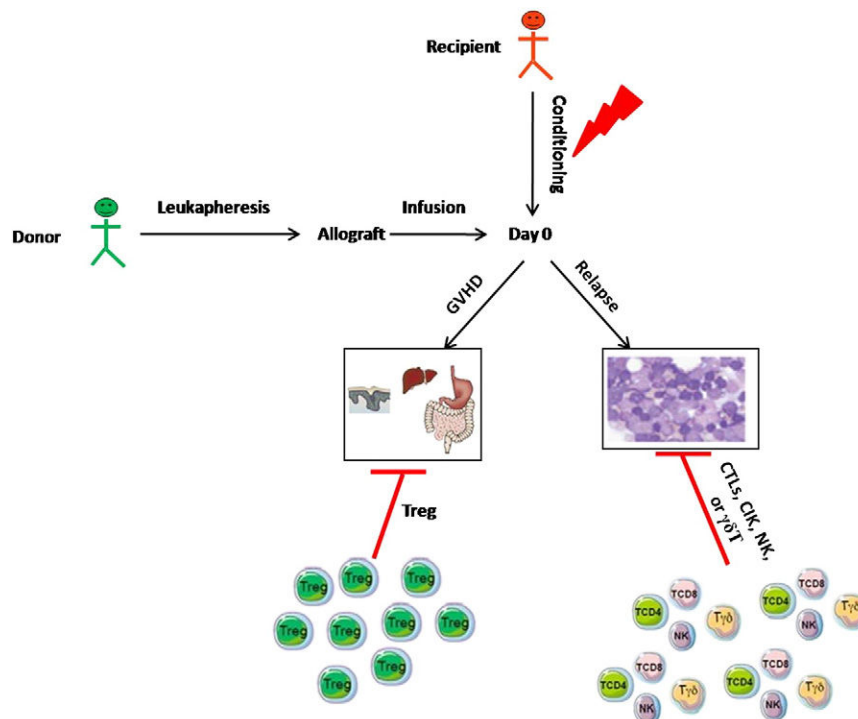


Fig 1. Complications after allo-HSCT such as GVHD and disease relapse can be managed by adoptive immunotherapeutic approaches (eg, Tregs, CTLs, $\gamma\delta$ T cells, CIK cells, or NK cells).

Regulatory T Cells in Clinical Trials

Less than 2 decades after their discovery, Tregs are now entering into clinical trials in allo-HSCT recipients. In the “first-in-man” clinical trial, Brunstein et al [18] established a method of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs enrichment from cryopreserved partially human leukocyte antigen (HLA)-matched third-party umbilical cord blood (UCB) units followed by a 18 ± 1 day expansion culture including anti-CD3/anti-CD28 antibody-coated beads and recombinant human interleukin 2 (IL-2). In vitro expanded Tregs were used in 23 patients undergoing double-cord blood transplantation. Regulatory T cells were administered on day +1 posttransplant (fresh) (doses ranging from 1 × 10⁵ to 3 × 10⁶/kg) and additionally on day +15 (3 × 10⁶/kg) in 13 patients, using cryopreserved Tregs expanded from the same cord blood unit. The rates of GVHD and infectious complications were compared with those from 108 historical controls. Importantly, no increase in opportunistic infections and no Tregs-related acute toxicity were observed. The authors did report a reduced incidence of grade II to IV aGVHDs (43% vs 61%; *P* = .05) in the trial group with no deleterious effect on risks of infection, relapse, or early mortality, but efficacy for the prevention of GVHD could not be demonstrated definitely in this phase I safety and feasibility trial, as standard pharmacologic prophylaxis was coadministered (cyclosporine A/mycophenolate mofetil or sirolimus/mycophenolate mofetil).

Di Ianni et al [19] have particularly studied the role of Tregs in the prophylaxis of GVHD in the course of haploidentical stem cell transplant. Regulatory T cells were isolated from standard leukapheresis products using a double-negative selection (anti-CD8 and anti-CD19 monoclonal antibodies) followed by positive selection (anti-CD25 monoclonal antibody) and then adoptively transferred into patients. As opposed to cord blood, in this study, the source of Tregs was from the donors who also provided the stem cells that were used to engraft the patients. In this report, 26 of 28 patients were engrafted, and only 2 of 26 patients had greater than or equal to grade II aGVHD. No patient developed cGVHD at the time of publication. CD4 and CD8 counts rapidly increased after transplant. Episodes of cytomegalovirus reactivation were significantly fewer than in controls.

An alternative approach to harness the potential for Tregs therapy in humans is based on the requirement of these cells for IL-2. Specifically, Koreth et al [20] found that daily low-dose IL-2 was safely administered in patients with active cGVHD that was refractory to glucocorticoid therapy. Administration was associated with preferential, sustained Tregs expansion in vivo and amelioration of the manifestations of cGVHD in a substantial proportion of patients. Moreover, ultra low-dose IL-2 for GVHD prophylaxis after allo-HSCT mediates expansion of Tregs without diminishing antiviral and antileukemic activity [21]. Thus, the administration of cytokines capable of inducing the in vivo expansion of Tregs may be a more clinically feasible strategy to enhance Tregs reconstitution posttransplantation, as compared to more costly expansion strategies.

Collectively, these studies are exciting evidence that Tregs therapy has now entered into the clinic; going forward, well-designed trials will be necessary to determine whether these cells are indeed capable of preventing and/or treating patients with established GVHD but also to determine the effects on infectious risk.

Relapse

Relapse after allogeneic HSCT is common with rates approaching 40% in those with high-risk disease and typically portends a very poor prognosis [22]. Traditionally, the detection of impending relapse in the posttransplantation period has been based on donor chimerism analysis, but the lack of specificity remains a problem. Therefore, interest focused on the minimal residual disease (MRD) diagnostics in the posttransplantation care of patients aiming to detect an increase of the leukemic cells at the earliest possible time [23]. The optimal treatment

strategy for relapsed leukemia remains uncertain. Withdrawal of immunosuppressive agents, reinduction chemotherapy, second HSCT, donor lymphocyte infusion (DLI) and supportive care are therapeutic options in leukemia relapse after HSCT. The graft-versus-leukemia (GVL) effect, which is mediated mainly by donor derived T cells, is the fundamental curative potential of DLI [24]. More recently, adoptive immunotherapy with DLI is used as relapse prophylaxis to provide full donor chimerism in patients with mixed and decreasing chimerism [24].

Donor Lymphocyte Infusion

Donor lymphocyte infusion is one of the most frequently used adoptive immunotherapy approaches to treat patients with relapse of hematologic malignancy after allo-HSCT. The DLI effect is mediated through the immunologic antitumor activity of donor T cells and possibly NK cells [25]. The efficacy of this approach is dependent upon the type of disease [26] and the dose of infused CD3⁺ lymphocytes [25].

Several reports have been published on use of DLI as treatment after HSCT (Table 1), trying to determine the efficacy of such strategy [26–28]. These studies have shown that DLI was a potentially effective therapeutic option for patients with a relapsed hematologic malignancy after HSCT. Owing to increased relapse rates after T-cell depletion allo-HSCT, several studies have examined the utility of prophylactic DLI (pDLI) to minimize tumor recurrence (Table 1) [29–31]. Liga et al [29] illustrated that patients with leukemias who received low-dose pDLI after conditioning with alemtuzumab were at low risk for relapse; however, this approach was associated with a relatively high incidence of severe GVHD. Wang et al [30] showed that a lower relapse rate and a higher survival probability were achieved with patients who received pDLI compared with patients who did not. The results suggested that prophylaxis of relapse with use of pDLI may increase the survival of patients with advanced-stage acute leukemia even after HLA-mismatched T cell-replete HSCT. Montero et al [31] emphasized the importance of cGVHD for sustaining a GVL effect after allo-HSCT and showed that it was possible to design protocols that minimize morbidity and mortality from GVHD. One way to overcome these problems was linked to the possibility of selecting leukocyte subpopulations with an effective GVL effect and reduced or absent GVHD [32].

Tumor-Specific CTLs

The GVL response lacks specificity resulting in GVHD. Therefore, considerable effort has been made to identify target antigens capable of inducing T-cell responses directed against tumor cells. These antigens fall into 2 categories: minor histocompatibility antigens (mHAg) expressed by leukemia progenitors and tumor-associated antigens (TAAs) representing diverse proteins over expressed by the leukemia [33].

Minor Histocompatibility Antigen-Specific CTLs

A subset of mHAg is expressed on recipient hematopoietic cells, including leukemic stem cells, but not on tissues affected by GVHD [34]. Marijt et al [35] reported clinical data on 3 mHAg histocompatibility antigens (HA)-1- and/or HA-2-positive patients with a relapse of their disease (2 chronic myeloid leukemias [CMLs] and 1 multiple myeloma) after allo-HSCT with DLI from their mHAg HA-1- and/or HA-2-negative donors. Strikingly, all 3 patients achieved complete remissions (CRs) subsequent to the emergence of HA-1- and HA-2-specific CD8⁺ T cells 5 to 7 weeks after DLI. Four years later, they presented the results of a phase I/II feasibility study assessing the logistics of generating leukemia-reactive CTL lines under Good Manufacturing Practices conditions and the potential toxicity and efficacy after administration to patients with relapsed leukemia after allo-HSCT. The CTL lines have shown moderate to high cytotoxic activity against original recipient leukemic cells in vitro. Eight patients with a relapse received from 1 to 7 CTL lines. One patient entered a CR after CTL infusion only; 1 entered a

Table 1
Published reports on use of DLI as prophylaxis or treatment after HSCT

Reference/follow-up after DLI	No.	Diseases	Donor source (N)	Cell dose ($\times 10^6$) cells are CD3 ⁺ T cells unless noted (N)	aGVHD grade II-IV	cGVHD	Response/relapse	OS	PFS/LFS	TRM
Huang et al 2007 [26]/1118 d	12	AML, ALL, CML	MRD	7-439/kg	6/12	7/12	tDLI 8/12	NR	1 y: 60% 2 y: 40%	NR
Huff et al 2006 [27]/CML, 857 d; other, 383 d	83	CML, MM, AML, MDS, ALL, HL, NHL	MRD	CML: 10/kg MM, MDS: 50/kg AML/ALL, HL, NHL: 100/kg dose escalation permitted BDR: 10-264/kg (n = 10) ESD: 1-300/kg (n = 20) Median dose: 2/kg	29/83	27/83	tDLI ORR: 37/83	CML CP at 2 y: 16/17 Others at 1 y: 9/66	NR	22/83
Michallet et al 2005 [28]/58 mo	30	CML, MM, AML, MDS, ALL, NHL	MRD URD	10/kg	4/30	3/30	tDLI ORR: 18/30	At 3 y CML: 80% Other: 48%	NR	NR
Liga et al 2013 [29]/575 d	15	AML, ALL	Related/ unrelated PBSC	Median dose: 2/kg	3/15 (20%)	3/15 (20%)	pDLI, no relapse	87% \pm 9%	72% \pm 12%	27%
Wang et al 2012 [30]/248 d	61	AML, ALL	HLA-mismatched PBSC	Median dose: 57/kg	41.9% \pm 30.5%	45.4% \pm 7.0%	pDLI 35.7% \pm 7.7%	30.5%	22%	38%
Montero et al 2006 [31]/47 mo	138	AML, ALL, CML MDS	Related marrow TCD	10/kg	53/138 (38%)	71/116 (61%)	pDLI 20% \pm 5%	58% \pm 5%	46% \pm 5%	20% \pm 4%

Abbreviations: BDR, bulk dosing regimen; CP, chronic phase; ESD, escalated dosing regimen; HL, Hodgkin lymphoma; LFS, leukemia-free survival; MM, multiple myeloma; NHL, non-Hodgkin lymphoma; No., number of patients; NR, not reported; ORR, objective response rate; OS, overall survival; PBSC, peripheral blood stem cell; PFS, progression-free survival; TCD, T cell depleted; tDLI, therapeutic DLI; TRM, treatment-related mortality; URD, unrelated donor.

CR after combined CTL infusion and DLI; 2 patients had temporarily stable disease; and in 4 patients, no response was observed [36].

Because mHAGs are also expressed on normal tissues, the suitability of this approach can be questioned. Warren et al [34] showed that a pulmonary toxicity of CTL infusion was seen in 3 of the 7 patients treated for recurrent leukemia after major histocompatibility complex (MHC)-matched allo-HSCT. This toxicity was severe in 1 patient and correlated with the level of expression of the mHAG-encoding genes in lung tissue. However, adoptively transferred CTLs persisted in the blood up to 21 days after infusion, and 5 patients achieved complete but transient remissions after therapy. It is also important to note that 3 patients require a treatment of GVHD suggesting that enhancing the GVL effect is not sufficient to avoid the development of GVHD.

Tumor-Associated Antigen-Specific CTLs

A number of TAA are known to be widely expressed by myeloid leukemias: Wilms tumor gene 1 (WT1), proteinase 3, human neutrophil elastase, melanoma-associated antigen A3, and preferentially expressed antigen in melanoma. The WT1 protein has been the TAA most extensively characterized. Wilms tumor gene 1 is overexpressed in various hematologic malignancies, including up to 70% of patients with acute myeloid leukemia (AML), acute lymphoblastic leukemia (ALL), CML, and myelodysplastic syndrome (MDS) [37]. A high level of WT1 expression by leukemic blasts in AML is associated with poor response to chemotherapy, greater risk of relapse, and reduced probability of extended disease-free survival [38]. Wilms tumor gene 1-specific CD8⁺ T lymphocytes can distinguish overexpressing targets from normal cells and have been demonstrated to inhibit the growth of and to lyse leukemic but not normal CD34⁺ cells [39]. It was reported that CD8⁺ T-cell responses against WT1 occurred in patients after HSCT and was associated with a reduction in malignant cells load and risk of relapse [37], and the median frequency of WT1-specific CTL (1.38%) in patients with molecular remission was significantly higher than that in those without molecular remission (0.38%) on day 30 after allo-HSCT [38].

Although the emergence of WT1-specific CTL has been correlated with better relapse-free survival after allo-HSCT, Chapuis et al [39] examined the potential to achieve a selective antileukemic effect by adoptive transfer of homogenous WT1-specific CD8⁺ CTL clones. HLA A*0201-restricted WT1-specific donor-derived CD8⁺ CTL clones were administered post-HSCT to 11 relapsed or high-risk leukemia patients

without any evidence of on-target toxicity. The last 4 treated patients received CTL clones generated with exposure to interleukin 21 (IL-21) as a means to prolong in vivo CTL survival, as IL-21 can limit terminal differentiation of antigen-specific T cells generated in vitro. Transferred cells exhibited direct evidence of antileukemic activity in 2 patients: a transient response in 1 patient with advanced progressive disease and the induction of a prolonged remission in a patient with MRD. In addition, 3 treated patients at high risk for relapse post-HSCT survived without leukemia relapse, GVHD, or additional antileukemic treatment. Another interesting point of this study is that the authors provided data about the in vivo survival of CTL. All remained detectable in the long term and maintained/acquired in vivo phenotypic and functional characteristics associated with long-lived memory CD8⁺ T cells.

The results of these studies illustrated the potential to selectively enhance GVL activity by the adoptive transfer of antigen-specific CTLs after allo-HSCT, and strategies to activate and/or expand CTLs for adoptive infusion are summarized in Table 2.

$\gamma\delta$ T Cells

$\gamma\delta$ T cells are lymphocytes capable of recognizing their targets in an MHC-independent manner through activating receptors (among others, $\gamma\delta$ TCR, NKG2D, TLRs, and DNAM-1) [49]. These cells display a preactivated phenotype that allows rapid cytokine production (interferon γ and tumor necrosis factor α) and strong cytotoxic response upon activation [50,51].

Lamb et al [52] first reported a role of that $\gamma\delta$ T cells in the protection against disease relapse after allo-HSCT for ALL or AML. Patients who received an $\alpha\beta$ T cell-depleted bone marrow grafts subsequently developed spontaneous increases in $\gamma\delta$ T-cell numbers during the first year after HSCT. These patients were found to have a significant improvement in disease-free survival when compared with similar-risk patients. It was interesting to note that the absolute increase in $\gamma\delta$ T cells persisted in surviving patients for up to several years after transplantation.

Godder et al [53] confirmed these results in an 8-year follow-up study, although another method to deplete $\alpha\beta$ T cells was used. All patients received a partially T cell-depleted graft using T10B9 (n = 46) or OKT3 (n = 107). $\gamma\delta$ T cells levels were collected prospectively in 153 patients (77 ALL; 76 AML) undergoing partially mismatched related donor

Table 2
Methods to isolate, activate, and expand cells for adoptive immunotherapies after HSCT

Cells	References	Starting population	Method	Culture conditions	Culture time
mHA _g CTLs	Marijt et al 2003 [35]	Donor PBMCs	Direct stimulation of PBMC with peptide, tetramer selection	Iscove's Modified Dulbecco Medium, 10% human serum, allogeneic feeder cells, phytohemagglutinin, IL-2	<1 d
mHA _g CTLs	Marijt et al 2007 [36]	Donor PBMCs	Direct stimulation of PBMC with peptide	IMDM supplemented with 10% donor heparin plasma, irradiated leukemic antigen-presenting cells, IL-2	3–4 wk
mHA _g CTLs	Warren et al 2010 [34]	Recipient posttransplantation PBMCs	Stimulation of PBMCs with irradiated recipient pretransplantation PBMCs and irradiated recipient-derived EBV-LCL	RPMI 1640 medium, L-glutamine, HEPES buffer, 1% penicillin/streptomycin, 2-mercaptoethanol, 10% heat-inactivated human AB serum, IL-2	10–12 wk
TAA CTLs	Chapuis et al 2013 [38]	Donor PBMCs	Bead-selected CD8 ⁺ T cells were stimulated autologous DCs and peptide	–	7–10 d
CIK	Introna et al 2007 [40]	Donor leukapheresis samples	Culture with rhIFN γ , OKT3 antibody, rhIL-2	X-VIVO serum-free medium, glutamine, gentamicin	20–26 d
CIK	Introna et al 2010 [41]	Mononuclear cells from UCB bag washouts	Culture with rhIFN γ , OKT3 antibody, rhIL-2	X-VIVO 15 serum-free medium, glutamine, gentamicin	21–28 d
CIK	Laport et al 2011 [42]	Donor leukapheresis samples	Culture with rhIFN γ , OKT3 antibody, rhIL-2	Aim-V medium, autologous (donor) heat-inactivated plasma	21–28 d
CIK	Linn et al 2012 [43]	Donor PBMCs	Culture with rhIFN γ , OKT3 antibody, rhIL-2	RPMI, 10% FCS	28 \pm 1 d
NK	Koehla et al 2004 [44]	Unstimulated leukaphereses	Two CD3 ⁺ depletion steps by CD3 MicroBeads with ensuing CD56 selection by CD56 MicroBeads	X-VIVO 10 media, 10% inactivated AB fresh frozen plasma, rhIL-2	10–14 d
NK	Brehm et al 2011 [45]				
NK	Stern et al 2013 [46]				
NK	Yoon et al 2010 [47]	Donor CD34 ⁺ progenitor cells	Culture with human stem cell factor, human fms-related tyrosine kinase 3 ligand, human IL-7	Myelocult complete medium, human IL-15, human IL-21, hydrocortisone	42 d
NK	Rizzieri et al 2010 [48]	Unstimulated leukaphereses	Using a CD56 antibody	–	Fresh

Abbreviations: AB, albumin; DC, dendritic cells; IL, interleukin; PBMC, peripheral blood mononucleated cell; rhIFN γ , recombinant human interferon γ ; rhIL-2, recombinant human IL-2.

allo-HSCT. Five-year leukemia-free survival and overall survival of patients with increased $\gamma\delta$ T cells compared to those with normal/decreased numbers were 54.4% vs 19.1% ($P < .0003$) and 70.8% vs 19.6% ($P < .0001$), respectively, with no difference in GVHD. In a Cox multivariate analysis, normal/decreased $\gamma\delta$ T cells were associated with inferior leukemia-free survival.

Although there were clinical trials on successful adoptive transfer of $\gamma\delta$ T cells for patients with advanced refractory hematologic malignancies (non-Hodgkin lymphoma, AML, and multiple myeloma) who were not eligible for allogeneic transplantation [54,55], we envision that it will eventually become possible to specifically transfer tumor-reactive donor-derived $\gamma\delta$ T cells as part of the transplantation strategy for the treatment of a variety of hematologic malignancies in the setting of allo-HSCT.

Cytokine-Induced Killer Cells

Cytokine-induced killer cells are cytotoxic effector T cells that are readily expandable and express in addition to the T-cell marker, CD3, markers typically associated with NK cells such as CD56 and NKG2D [42]. Because of the very strong non-HLA-restricted NK-like cytotoxicity of CIK cells and, more importantly, based on the preclinical observations that CIK cells almost completely lack GVHD activity in allogeneic settings, investigators suggested that donor-derived CIK cells can be administered to lymphoma/leukemia patients who relapsed after allo-HSCT [43].

Two phase I clinical trials on the use of CIK cells in allogeneic context for hematologic malignancies were performed by Introna et al [40,41]. In the first study, 11 patients with hematologic malignancies who had relapsed after sibling ($n = 6$) or matched unrelated donor ($n = 5$) HSCT received at least 1 to 7 CIK cells infusion. Cytokine-induced killer cells were generated after 22 days of in vitro expansion. Grade I and II aGVHDs were observed in 4 patients 30 days after the last CIK cell infusion, and these progressed into extensive cGVHD in 2 cases. Disease progression and death occurred in 6 patients. Then, the same group focused their attention on patients with aggressive acute leukemias, who had

relapsed after cord blood transplantation, and demonstrated the feasibility of producing CIK cells by ex vivo cell expansion using as starting material the washouts of the cord blood unit bags. Using this protocol, they did not observe any acute or delayed adverse event and observed 1 partial response in 1 patient, concomitantly with the development of grade III aGVHD. These observations have shown the relatively low toxicity of cord blood-derived CIK cells and, more importantly, the feasibility of this immunotherapy program for patients who could not otherwise benefit from DLI.

In another phase I clinical trial to evaluate the feasibility and safety of allogeneic CIK cells, 18 patients who had relapsed after allo-HSCT from a matched sibling donor received CIK cell infusions at escalating doses. Grade I to II aGVHD was seen in 2 patients, and 1 patient had limited cGVHD. After a median follow-up of 20 months (range, 1–69 months) from CIK infusion, the median overall survival was 28 months, and the median event-free survival was 4 months. All deaths were due to relapsed disease; however, 5 patients had longer remissions after infusion of CIK cells than from allo-HSCT to relapse [42].

These results have been confirmed in a more recent experience, where 24 patients with hematologic malignancies who relapsed after allo-HSCT (15 from sibling, 9 from unrelated donors) were enrolled to receive allogeneic CIK cells. Of 16 treated patients, no response was seen in 6 of them. Five were not evaluable. Five patients showed an antitumor activity of CIK cells. Interestingly, 2 of the responders had a response sustained for more than 2 years. Graft-versus-host disease occurred in 3 and was easily treatable [43].

These phase I clinical studies suggested that CIK was a promising and safe modality for treating hematologic malignancies relapse after allo-HSCT. Multicenter phase II clinical trials are now warranted to further establish the validity of this therapeutic approach and optimize the CIK treatment protocol. This therapy should be further improved through increasing the specificity of CIK cells via immunologic and genetic engineering approaches and identifying robust predictive biomarkers for patient stratification. In addition, we believe that combining chemotherapy, radiotherapy, or other immunotherapy approaches with CIK will further improve cancer therapy and prolong

survival of cancer patients. Furthermore, the preemptive use of CIK cells to treat a cytogenetic or molecular relapse also seems rational. Determining the effectiveness of this strategy will certainly be a major aim of a future clinical study with CIK cells.

The strategies to activate and/or expand CIK cells for adoptive infusion are summarized in [Table 2](#).

Natural Killer Cells

Natural killer cells, defined as CD3⁺CD56⁺ lymphocytes, are distinguished as CD56^{bright} and CD56^{dim} subsets. CD56^{dim}CD16⁺ NK cells are fully mature, make up approximately 90% of the NK cells in peripheral blood, and predominantly mediate cytotoxicity response. In contrast, CD56^{bright}CD16⁺ NK cells are more immature, make up approximately 5% to 15% of total NK cells, and have been considered primarily as cytokine producers [56]. Natural killer cells rapidly kill certain target cells without prior immunization or MHC restriction, whose activation is dependent on the balance between inhibitory and activating signals from invariant receptors [57]. This leads to 3 immediate linked thoughts: first, that it is logical that this cell be harnessed for antitumor properties; second, that this cell type might prevent T cell-mediated GVHD through killing of recipient-type dendritic cells that initiate GVHD by presenting host alloantigens to donor T cells; and third, that some tumor cells avoid recognition by CTL by down-regulating their expression of MHC-I, but these escape mutants consequently become targets for NK cells because they lack the inhibitory receptor ligands.

In the last years, several groups explored possible approaches of adoptive immunotherapy based on the infusion of either selected or ex vivo activated/expanded NK cells post-HSCT mainly in a haploidentical setting [58]. To provide a greater number of NK cells with a differentiated activated phenotype for adoptive immunotherapy, some authors described cytokine-based methods useful for clinical scale

NK cell production [59,60]. To date, 5 different clinical trials addressed this issue (see [Tables 2 and 3](#) for details) [44–48]. Rizzieri et al [48] presented CD56 enrichment procedure obtaining a mixture out of CD56⁺CD3[−] NK and CD56[−]CD3⁺ T cells. However, clinical application of mixed populations in an allogeneic setting seemed critical, as it may not be possible to determine the cell population responsible for adverse events related to immunotherapy. Therefore, Koehla et al [44] and other investigators [44–46] used a Good Manufacturing Practices-compliant system with 2 CD3 depletion steps and a final CD56 enrichment procedure, which lead to a median purity of 95% CD56⁺CD3[−] NK cells. In the study of Yoon et al [47], donor NK cells were generated from the CD34⁺ cells by ex vivo cell culture over a 6-week period; such a process requires substantial workforce and laboratory facilities. Till now, very little is known about the effects of NK cell administration post-HSCT. These 5 heterogeneous small patient cohorts provide first insights on the distinct influence of NK cells infusions; further large patient studies are needed to determine the optimal dose and timing of NK cell immunotherapy for antileukemia activity, for activation and expansion of NK cells, and for hastening immune recovery.

Altogether, the 5 studies mentioned above demonstrated that the infusion of allogeneic NK cells after HSCT, either immediately after collection or after ex vivo activation, was largely safe with a very low or no incidence of GVHD. Although some responses were encouraging, the real clinical benefit of this procedure, however, remains to be definitively proven with larger cohort of patients. The results of ongoing clinical trials will also provide information about the efficacy of this therapy.

Cross-Talk Between Tregs and NK Cells After HSCT

Because of rapid recovery of NK cells early after HSCT and their ability to kill malignant targets, they have been considered as one of the main effector cells that mediate early GVL reactions. Regulatory T cells

Table 3
Results of studies addressing NK adoptive immunotherapy after HSCT

Reference	Approach	Disease	Source of NK cells	Dose	Results
Koehla et al 2004 [44]	Infusion of IL-2-activated NK cells on days +1 or +2 post-HSCT, followed by additional administration every 4–6 wk after HLA-mismatched HSCT	2 ALL, 1 AML	Donors HSC	NK cells were infused at a median dose of 16.15×10^6 cells/kg	Well tolerated without GVHD or other adverse events. The AML patient died of early relapse on day +80, whereas the ALL patients died of thrombotic-thrombocytopenic purpura and atypical viral pneumonia on days +45 and +152, respectively.
Yoon et al 2010 [47]	Infusion of IL-15/21-activated NK cells (generated from CD34 ⁺ donor cells) after HLA-mismatched HSCT	Acute leukemias, MDS	Donors HSC	Infusion at a median dose of 9.28×10^6 cells/kg	Primary end point was feasibility (no toxicity was reported; low-grade aGVHD and cGVHD appeared), 4 of 14 (28%) alive and well
Rizzieri et al 2010 [48]	8 wk after a 3–6/6 HLA-matched T cell-depleted NMA allogeneic transplant, donor NK cell-enriched DLIs were processed using a CD56 ⁺ selecting with up to 3 fresh infusions allowed.	Fludarabine-based T cell-depleted NMA allogeneic transplant regimen with alemtuzumab.	Donors HSC	The median number of CD3 [−] CD56 ⁺ NK cells infused was 10.6×10^6 cells/kg in the matched setting and 9.21×10^6 cells/kg in the mismatched setting.	1 patient each in the matched (n = 14) or mismatched (n = 16) setting experienced severe aGVHD with little other infusion toxicity. Long-term responders with multiple NK cell-enriched infusions and improved T-cell phenotypic recovery had improved duration of responses and overall survival.
Brehm et al 2011 [45]	Infusion of fresh and/or ex vivo IL-2 activated NK cells on day +3, +40 and +100 after haploidentical HSCT	High-risk leukemia or tumors underwent haploidentical HSCT	Donors HSC	The median number of fresh and ex vivo IL-2-activated NK cells infused was 14.1×10^6 cells/kg and 15.0×10^6 cells/kg, respectively.	Transfer of activated NK cells translated into significantly increased levels of various cytokines/chemokines (ie, IFN- γ , IL-6, MIP-1 β) in patients' PB. In contrast, fresh NK cells did not cause any of the observed effects.
Stern et al 2013 [46]	Infusion of positively selected NK cells after haploidentical HSCT	High-risk leukemia or highly malignant solid tumors	Donors HSC	1–3 infusions of positively selected NK cells at a median dose of 1.21×10^7 cells/kg	4 (25%) of 16 alive and well

Abbreviations: IFN, interferon; MIP, macrophage inflammatory protein; NMA, nonmyeloablative; PB, peripheral blood.

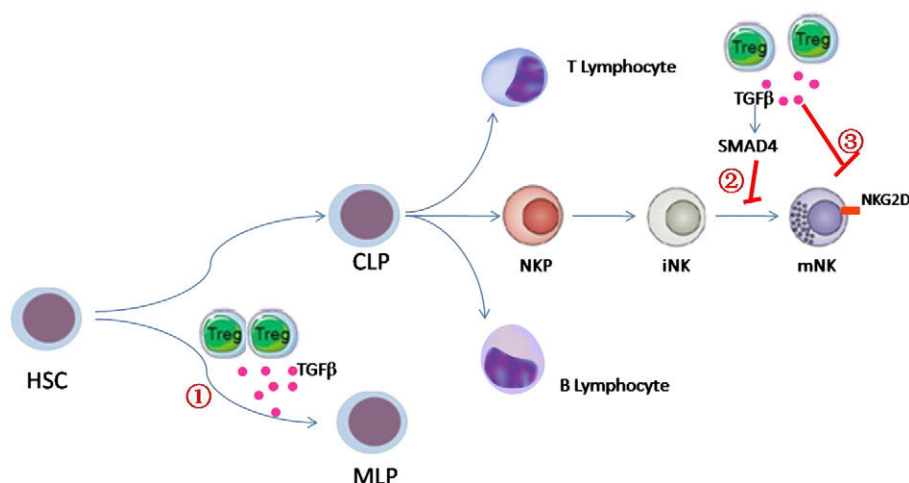


Fig 2. Hypothesis of the effects of Tregs on NK cells in HSCT. ① Transforming growth factor β can promote the differentiation of myeloid progenitors rather than lymphoid progenitors, which could potentially affect NK cell differentiation. ② Transforming growth factor β , through SMAD4, may have an effect on NK cell differentiation. ③ Transforming growth factor β diminishes the expression of NKG2D, the NK cell-activating receptor, which leads to reduced NK cell cytotoxicity toward targets. CLP, common lymphoid progenitor; MLP, myeloid progenitor; NKP, natural killer progenitor; iNK, immature natural killer; mNK, mature natural killer.

are quite beneficial in protecting from GVHD, but they may also impair NK cell-mediated GVL [61,62]. Several authors have proposed that the inhibition of NK cells by Tregs is mediated by transforming growth factor β (TGF- β) [63–66]. Actually, different models have shown that TGF- β 1 affects NK cell differentiation and maturation (1) by promoting myeloid hematopoietic stem cell (HSC) rather than lymphoid HSC differentiation in transplanted mice and (2) by leading to an overexpression of SMAD4, a protein involved in the signaling cascade of TGF- β , in HSC, with a down-regulation of the transcription factor PU.1 involved in NK cell differentiation and maturation [67–69]. This suggested that TGF- β -mediated Tregs may be one of the factors responsible for NK cell immaturity. In addition, some investigators suggested that TGF- β diminishes the expression of NKG2D, the NK cell-activating receptor, which leads to reduced NK cell cytotoxicity toward targets (Fig 2) [63,64,70]. Although murine experiments and human in vitro studies supported the assertion that Tregs antagonize NK cell responses, early clinical studies have not shown a detrimental impact of Tregs therapy on relapse. However, taking into account of all the studies published on the effects of Tregs of NK cells, it seems obvious that Tregs and NK infusions should be performed at different time frame.

Conclusion and Future Directions

Donor alloreactive T cell-mediated GVHD and relapse of the underlying malignant disease are still the major reasons for early and late mortality after HSCT. Although tremendous progress has been achieved in the last decade, elimination of alloreactive T cells and preserving tumor- and pathogen-specific immunity will still be a major task to further improve the outcome after HSCT. Genetic reprogramming of Tregs [71,72] or engineered T-cell receptors that redirect Tregs specificity [73] could improve Tregs potency. Creating either bispecific or trispecific killer engagers to redirect NK or CIK cytotoxicity toward tumor cells [74–76] or redirecting NK, CIK, CTLs, and $\gamma\delta$ T cells toward tumor targets through a chimeric antigen receptor can effectively increase these cell reactivities and specificities of recognitions [77–81]. Third party-derived T-cell infusion is being currently investigated as potential solution to overcome the availability limitation; other solutions (eg, rapid T-cell generation, simplify and shorten CTL production) should also continue to be tested to further broaden the application of this approach [82].

Despite recent developments in enhancing the specificity of adoptive immunotherapies, unanswered questions remain: how to define the appropriate cell dose for optimal therapeutic response and minimal toxicity? What is the best schedule to infuse these cells? Should these be

infused as a preemptive or a curative therapeutic dose? Future clinical trials will need to address these questions.

Conflict of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgments

This study was supported by an Oversea Study Fellowship from the China Scholarship Council (<http://www.csc.edu.cn/>) number 201308420488. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

References

- [1] McClune BL, Ahn KW, Wang HL, et al. Allogeneic transplantation for patients age ≥ 40 years with non-Hodgkin lymphoma: encouraging progression-free survival. *Biol Blood Marrow Transplant* 2014;20:960–8.
- [2] Shook DR, Triplett BM, Srinivasan A, et al. Successful allogeneic hematopoietic cell engraftment after a minimal conditioning regimen in children with relapsed or refractory solid tumors. *Biol Blood Marrow Transplant* 2013;19:291–7.
- [3] Kharbanda S, Smith AR, Hutchinson SK, et al. Unrelated donor allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for patients with hemoglobinopathies using a reduced-intensity conditioning regimen and third-party mesenchymal stromal cells. *Biol Blood Marrow Transplant* 2014;20:581–6.
- [4] Kurosawa S, Yakushijin K, Yamaguchi T, et al. Recent decrease in non-relapse mortality due to GVHD and infection after allogeneic hematopoietic cell transplantation in non-relapse acute leukemia. *Bone Marrow Transplant* 2013;48:1198–204.
- [5] Garnett C, Apperley JF, Pavlu J. Treatment and management of graft-versus-host disease: improving response and survival. *Ther Adv Hematol* 2013;4:366–78.
- [6] Levine JE. Implications of TNF- α in the pathogenesis and management of GVHD. *Int J Hematol* 2011;93:571–7.
- [7] Qian L, Wu Z, Shen J. Advances in the treatment of acute graft-versus-host disease. *J Cell Mol Med* 2013;17:966–75.
- [8] Espana EM, Shah S, Santhiago MR, Singh AD. Graft versus host disease: clinical evaluation, diagnosis and management. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2013;251:1257–66.
- [9] Haase D, Starke M, Puan KJ, Lai TS, Rotzschke O. Immune modulation of inflammatory conditions: regulatory T cells for treatment of GVHD. *Immunol Res* 2012;53:200–12.
- [10] Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003;299:1057–61.
- [11] Magenau JM, Qin X, Tawara I, et al. Frequency of CD4(+) CD25(hi) FOXP3(+) regulatory T cells has diagnostic and prognostic value as a biomarker for acute graft-versus-host-disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010;16:907–14.
- [12] Li Q, Zhai Z, Xu X, et al. Decrease of CD4(+) CD25(+) regulatory T cells and TGF- β at early immune reconstitution is associated to the onset and severity of graft-versus-host disease following allogeneic haematogenesis stem cell transplantation. *Leuk Res* 2010;34:1158–68.

- [13] Bremm M, Huenecke S, Lehrnbecher T, et al. Advanced flowcytometric analysis of regulatory T cells: CD127 downregulation early post stem cell transplantation and altered Treg/CD3(+)/CD4(+)-ratio in severe GVHD or relapse. *J Immunol Methods* 2011;373:36–44.
- [14] McIver Z, Melenhorst JJ, Wu C, et al. Donor lymphocyte count and thymic activity predict lymphocyte recovery and outcomes after matched-sibling hematopoietic stem cell transplant. *Haematologica* 2013;98:346–52.
- [15] Schneider M, Munder M, Karakhanova S, Ho AD, Goerner M. The initial phase of graft-versus-host disease is associated with a decrease of CD4+CD25+ regulatory T cells in the peripheral blood of patients after allogeneic stem cell transplantation. *Clin Lab Haematol* 2006;28:382–90.
- [16] Watanabe N, Narita M, Furukawa T, et al. Kinetics of pDCs, mDCs, $\gamma\delta$ T cells and regulatory T cells in association with graft versus host disease after hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Lab Hematol* 2011;33:378–90.
- [17] Ukena SN, Grosse J, Mischak-Weissinger E, et al. Acute but not chronic graft-versus-host disease is associated with a reduction of circulating CD4(+) CD25(high) CD127(low/-) regulatory T cells. *Ann Hematol* 2011;90:213–8.
- [18] Brunstein CG, Miller JS, Cao Q, et al. Infusion of ex vivo expanded T regulatory cells in adults transplanted with umbilical cord blood: safety profile and detection kinetics. *Blood* 2011;117:1061–70.
- [19] Di Ianni M, Falzetti F, Carotti A, et al. Immunoselection and clinical use of T regulatory cells in HLA-haploidentical stem cell transplantation. *Best Pract Res Clin Haematol* 2011;24:459–66.
- [20] Koreth J, Matsuoka K, Kim HT, et al. Interleukin-2 and regulatory T cells in graft-versus-host disease. *N Engl J Med* 2011;365:2055–66.
- [21] Kennedy-Nasser AA, Ku S, Castillo-Caro P, et al. Ultra low-dose IL-2 for GVHD prophylaxis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation mediates expansion of regulatory T cells without diminishing antiviral and antileukemic activity. *Clin Cancer Res* 2014;20:2215–25.
- [22] Miller JS, Warren EH, van den Brink MRM, et al. NCI first international workshop on the biology, prevention, and treatment of relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: report from the committee on the biology underlying recurrence of malignant disease following allogeneic HSCT: graft-versus-tumor/leukemia reaction. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010;16:565–86.
- [23] Bacher U, Talano JA, Bishop MR. Monitoring and prevention of relapse after allogeneic hematopoietic cell transplantation for myeloid malignancies. *Biol Blood Marrow Transplant* 2012;18:S62–73.
- [24] Yegin ZA, Ozkurt ZN, Aki SZ, Sucak GT. Donor lymphocyte infusion for leukemia relapse after hematopoietic stem cell transplantation. *Transfus Apher Sci* 2010;42:239–45.
- [25] Bar M, Sandmaier BM, Inamoto Y, et al. Donor lymphocyte infusion for relapsed hematological malignancies after allogeneic hematopoietic cell transplantation: prognostic relevance of the initial CD3+ T cell dose. *Biol Blood Marrow Transplant* 2013;19:949–57.
- [26] Huang XJ, Liu DH, Liu KY, Xu LP, Chen H, Han W. Donor lymphocyte infusion for the treatment of leukemia relapse after HLA-mismatched/haploidentical T-cell-replete hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica* 2007;92:414–7.
- [27] Huff CA, Fuchs EJ, Smith BD, et al. Graft-versus-host reactions and the effectiveness of donor lymphocyte infusions. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006;12:414–21.
- [28] Michallet AS, Nicolini F, Furst S, et al. Outcome and long-term follow-up of alloreactive donor lymphocyte infusions given for relapse after myeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantations (HSCT). *Bone Marrow Transplant* 2005;35:601–8.
- [29] Liga M, Triantafyllou E, Tiniakou M, et al. High alloreactivity of low-dose prophylactic donor lymphocyte infusion in patients with acute leukemia undergoing allogeneic hematopoietic cell transplantation with an alemtuzumab-containing conditioning regimen. *Biol Blood Marrow Transplant* 2013;19:75–81.
- [30] Wang Y, Liu DH, Xu LP, et al. Prevention of relapse using granulocyte CSF-primed PBPCs following HLA-mismatched/haploidentical, T-cell-replete hematopoietic SCT in patients with advanced-stage acute leukemia: a retrospective risk-factor analysis. *Bone Marrow Transplant* 2012;47:1099–104.
- [31] Montero A, Savani BN, Shenoy A, et al. T cell depleted peripheral blood stem cell allotransplantation with T cell add back for patients with hematological malignancies: effect of chronic GVHD on outcome. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006;12:1318–25.
- [32] Deol A, Lum LG. Role of donor lymphocyte infusions in relapsed hematological malignancies after stem cell transplantation revisited. *Cancer Treat Rev* 2010;36:528–38.
- [33] Barrett AJ. Understanding and harnessing the graft-versus-leukaemia effect. *Br J Haematol* 2008;142:877–88.
- [34] Warren EH, Fujii N, Akatsuka Y, et al. Therapy of relapsed leukemia after allogeneic hematopoietic cell transplantation with T cells specific for minor histocompatibility antigens. *Blood* 2010;115:3869–78.
- [35] Marijt WA, Heemskerck MH, Kloosterboer FM, et al. Hematopoiesis-restricted minor histocompatibility antigens HA-1- or HA-2-specific T cells can induce complete remissions of relapsed leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:2742–7.
- [36] Marijt E, Wafelman A, van der Hoorn M, et al. Phase I/II feasibility study evaluating the generation of leukemia-reactive cytotoxic T lymphocyte lines for treatment of patients with relapsed leukemia after allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica* 2007;92:72–80.
- [37] Tyler EM, Jungbluth AA, O'Reilly RJ, Koehne G. WT1-specific T-cell responses in high-risk multiple myeloma patients undergoing allogeneic T cell-depleted hematopoietic stem cell transplantation and donor lymphocyte infusions. *Blood* 2013;121:308–17.
- [38] Wang ZD, Dan L, Huang XJ. Graft-versus-leukemia effects of Wilms' tumor 1 protein-specific cytotoxic T lymphocytes in patients with chronic myeloid leukemia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Chin Med J* 2010;123:912–6.
- [39] Chapuis AG, Ragnarsson GB, Nguyen HN, et al. Transferred WT1-reactive CD8+ T cells can mediate antileukemic activity and persist in post-transplant patients. *Sci Transl Med* 2013;5:174–98.
- [40] Introna M, Borleri G, Conti E, et al. Repeated infusions of donor-derived cytokine-induced killer cells in patients relapsing after allogeneic stem cell transplantation: a phase I study. *Haematologica* 2007;92:952–9.
- [41] Introna M, Pievani A, Borleri G, et al. Feasibility and safety of adoptive immunotherapy with CIK cells after cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010;16:1603–7.
- [42] Laport GG, Sheehan K, Baker J, et al. Adoptive immunotherapy with cytokine-induced killer cells for patients with relapsed hematologic malignancies after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011;17:1679–87.
- [43] Linn YC, Niam M, Chu S, et al. The anti-tumour activity of allogeneic cytokine-induced killer cells in patients who relapse after allogeneic transplant for haematological malignancies. *Bone Marrow Transplant* 2012;47:957–66.
- [44] Koehla U, Sorensen J, Esser R, et al. IL-2 activated NK cell immunotherapy of three children after haploidentical stem cell transplantation. *Blood Cells Mol Dis* 2004;33:261–6.
- [45] Brehm C, Huenecke S, Quaiser A, et al. IL-2 stimulated but not unstimulated NK cells induce selective disappearance of peripheral blood cells: concomitant results to a phase I/II study. *PLoS One* 2011;6:e27351.
- [46] Stern M, Passweg JR, Meyer-Monard S, et al. Pre-emptive immunotherapy with purified natural killer cells after haploidentical SCT: a prospective phase II study in two centers. *Bone Marrow Transplant* 2013;48:433–8.
- [47] Yoon SR, Lee YS, Yang SH, et al. Generation of donor natural killer cells from CD34+ progenitor cells and subsequent infusion after HLA-mismatched allogeneic hematopoietic cell transplantation: a feasibility study. *Bone Marrow Transplant* 2010;45:1038–46.
- [48] Rizzieri DA, Storms R, Chen DF, et al. Natural killer cell-enriched donor lymphocyte infusions from A 3-6/6 HLA matched family member following nonmyeloablative allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010;16:1107–14.
- [49] Bonneville M, O'Brien RL, Born WK. $\gamma\delta$ T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat Rev Immunol* 2010;10:467–78.
- [50] Hayday AC. $\gamma\delta$ T cells and the lymphoid stress-surveillance response. *Immunity* 2009;31:184–96.
- [51] Jameson J, Havran WL. Skin $\gamma\delta$ T-cell functions in homeostasis and wound healing. *Immunol Rev* 2007;215:114–22.
- [52] Lamb Jr LS, Henslee-Downey PJ, Parrish RS, et al. Increased frequency of TCR gamma delta T cells in disease-free survivors following T cell-depleted, partially mismatched, related donor bone marrow transplantation for leukemia. *J Hematother* 1996;5:503–9.
- [53] Godder KT, Henslee-Downey PJ, Mehta J, et al. Long term disease-free survival in acute leukemia patients recovering with increased $\gamma\delta$ T cells after partially mismatched related donor bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2007;39:751–7.
- [54] Wilhelm M, Kunzmann V, Eckstein S, et al. $\gamma\delta$ T cells for immune therapy of patients with lymphoid malignancies. *Blood* 2003;102:200–6.
- [55] Abea Y, Muto M, Nieda M, et al. Clinical and immunological evaluation of zoledronate-activated V γ 9 $\gamma\delta$ T-cell-based immunotherapy for patients with multiple myeloma. *Exp Hematol* 2009;37:956–68.
- [56] Horowitz A, Strauss-Albee DM, Leipold M, et al. Genetic and environmental determinants of human NK cell diversity revealed by mass cytometry. *Sci Transl Med* 2013;5:208ra145.
- [57] Farag SS, Fehniger TA, Ruggeri L, Velardi A, Caligiuri MA. Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. *Blood* 2002;100:1935–47.
- [58] Locatelli F, Moretta F, Brescia L, Merli P. Natural killer cells in the treatment of high-risk acute leukaemia. *Semin Immunol* 2014;26:173–9.
- [59] Barkholt L, Alici E, Conrad R, et al. Safety analysis of ex vivo-expanded NK and NK-like T cells administered to cancer patients: a phase I clinical study. *Immunotherapy* 2009;1:753–64.
- [60] Decot V, Voillard L, Latger-Cannard V, et al. Natural-killer cell amplification for adoptive leukemia relapse immunotherapy: comparison of three cytokines, IL-2, IL-15, or IL-7 and impact on NKG2D, KIR2DL1, and KIR2DL2 expression. *Exp Hematol* 2010;38:351–62.
- [61] Vermeris MR. Natural killer cells and regulatory T cells: how to manipulate a graft for optimal GVL. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2013;2013:335–41.
- [62] Ralainirina N, Poli A, Michel T, et al. Control of NK cell functions by CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Leukoc Biol* 2007;81:144–53.
- [63] Ghiringhelli F, Menard C, Terme M, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor- β -dependent manner. *J Exp Med* 2005;202:1075–85.
- [64] Smyth MJ, Teng MW, Swann J, Kyparissoudis K, Godfrey DI, Hayakawa Y. CD4+CD25+ T regulatory cells suppress NK cell-mediated immunotherapy of cancer. *J Immunol* 2006;176:1582–7.
- [65] Barao I, Hanash AM, Hallett W, et al. Suppression of natural killer cell-mediated bone marrow cell rejection by CD4+CD25+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:5460–5.
- [66] Trzonkowski P, Szmít E, Mysliwska J, Dobyszek A, Mysliwski A. CD4+CD25+ T regulatory cells inhibit cytotoxic activity of T CD8+ and NK lymphocytes in the direct cell-to-cell interaction. *Clin Immunol* 2004;112:258–67.
- [67] Challen GA, Boles NC, Chambers SM, Goodell MA. Distinct hematopoietic stem cell subtypes are differentially regulated by TGF-beta1. *Cell Stem Cell* 2010;6:265–78.
- [68] Rorby E, Nifelt Hagerstrom M, Blank U, Karlsson G, Karlsson S. Human hematopoietic stem/progenitor cells overexpressing Smad4 exhibit impaired reconstitution potential in vivo. *Blood* 2012;120:4343–51.

- [69] Marcoe JP, Lim JR, Schaubert KL, et al. TGF-beta is responsible for NK cell immaturity during ontogeny and increased susceptibility to infection during mouse infancy. *Nat Immunol* 2012;13:843–50.
- [70] Castriconi R, Cantoni C, Della Chiesa M, et al. Transforming growth factor β 1 inhibits expression of NKp30 and NKG2D receptors: consequences for the NK-mediated killing of dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:4120–5.
- [71] Ermann J, Hoffmann P, Edinger M, et al. Only the CD62L+ subpopulation of CD4+ CD25+ regulatory T cells protects from lethal acute GVHD. *Blood* 2005;105:2220–6.
- [72] Levine BL, Humeau LM, Boyer J, et al. Gene transfer in humans using a conditionally replicating lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:17372–7.
- [73] Hori S, Haurly M, Coutinho A, Demengeot J. Specificity requirements for selection and effector functions of CD25+4+ regulatory T cells in anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:8213–8.
- [74] Kellner C, Bruenke J, Horner H, et al. Heterodimeric bispecific antibody-derivatives against CD19 and CD16 induce effective antibody-dependent cellular cytotoxicity against B-lymphoid tumor cells. *Cancer Lett* 2011;303:128–39.
- [75] Tita-Nwa F, Moldenhauer G, Herbst M, Kleist C, Ho AD, Kornacker M. Cytokine-induced killer cells targeted by the novel bispecific antibody CD19xCD5 (HD37xT5.16) efficiently lyse B-lymphoma cells. *Cancer Immunol Immunother* 2007;56:1911–20.
- [76] Gleason MK, Verneris MR, Todhunter DA, et al. Bispecific and trispecific killer cell engagers directly activate human NK cells through CD16 signaling and induce cytotoxicity and cytokine production. *Mol Cancer Ther* 2012;11:2674–84.
- [77] Jiang H, Zhang W, Shang P, et al. Transfection of chimeric anti-CD138 gene enhances natural killer cell activation and killing of multiple myeloma cells. *Mol Oncol* 2014;8:297–310.
- [78] Grupp SA, Kalos M, Barrett D, et al. Chimeric antigen receptor–modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med* 2013;368:1509–18.
- [79] Dutour A, Marin V, Pizzitola I, et al. In vitro and in vivo antitumor effect of anti-CD33 chimeric receptor-expressing EBV-CTL against CD33 acute myeloid leukemia. *Ther Adv Hematol* 2012;2012:337–51 (683065).
- [80] Casucci M, Nicolis di Robilant B, Falcone L, et al. CD44v6-targeted T cells mediate potent antitumor effects against acute myeloid leukemia and multiple myeloma. *Blood* 2013;122:3461–72.
- [81] Tettamanti S, Marin V, Pizzitola I, et al. Targeting of acute myeloid leukaemia by cytokine-induced killer cells redirected with a novel CD123-specific chimeric antigen receptor. *Br J Haematol* 2013;161:389–401.
- [82] Leen AM, Tripic T, Rooney CM. Challenges of T cell therapies for virus-associated diseases after hematopoietic stem cell transplantation. *Expert Opin Biol Ther* 2010;10:337.

IL-15 as a potential target in leukemia

Yu Xiong^{1,2}

Danièle Bensoussan^{1,3}

Véronique Decot^{1,3}

¹Cell Therapy Department, University Hospital of Nancy, Vandoeuvre les Nancy, France; ²Institute of Hepatobiliary Diseases, Transplant Center, Wuhan University, Hubei Key Laboratory of Medical Technology on Transplantation, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan, People's Republic of China; ³UMR CNRS UL 7365, Lorraine University, Vandoeuvre les Nancy, France



Correspondence: Véronique Decot
Cell Therapy and Tissue Unit, CHU
Nancy, Allée du Morvan, Vandoeuvre
les Nancy, 54511, France
Tel +33 383153779
Fax +33 383154858
Email v.decot@chu-nancy.fr

Abstract: Leukemia, one of the most aggressive hematopoietic malignancies, is characterized by excessive proliferation, survival, and impaired differentiation of hematopoietic stem cells. Interleukin 15, a proinflammatory cytokine, induces proliferation and promotes cell survival of human T and B lymphocytes, as well as natural killer cells. However, it may also play a detrimental role in the onset of leukemia. This review provided an overview of the aberrant expression of Interleukin 15 and its role in the development and progression of this hematological malignancy. Also, we critically explored the potential therapeutic opportunities involved in targeting the disruption of interleukin-15 signaling as well as in interleukin-15-mediated enhancement of antitumor immunity.

Keywords: leukemia, interleukin-15, immunotherapy

Leukemia

Leukemia is a complex and heterogeneous group of diseases and is characterized as the abnormal proliferation of immature cells of the hematopoietic system. The most widely accepted classification system is the World Health Organization system, which encompasses etiologic, morphologic, immunophenotypic, clinical, genetic, and molecular features and incorporates scientific and clinical information to refine diagnostic criteria. Among the most common forms of leukemia are two acute variants, acute lymphoblastic leukemia (ALL) and acute myeloid leukemia (AML), and two chronic variants, chronic myeloid leukemia (CML) and chronic lymphoblastic leukemia (CLL).¹

Current treatment options and patient outcomes

AML is characterized by the inhibition of differentiation and the subsequent accumulation of hematopoietic stem cells at various stages of incomplete maturation, and by reduced production of healthy hematopoietic elements.² AML is a heterogeneous disease that can be classified in as many as seven subtypes.³ These subtypes are characterized by a variety of cytogenetic and cell surface markers. The standard treatment for AML is induction chemotherapy with an anthracycline/cytarabine combination, followed by either consolidation chemotherapy (commonly high-dose cytarabine) or allogeneic stem cell transplantation, depending on the patient's ability to tolerate intensive treatment and the likelihood of cure with chemotherapy alone.⁴ The goal of induction chemotherapy is to achieve complete remission (CR). Once this is achieved, consolidation is given to maintain the remission.⁵ The duration of initial CR,⁶ and cytogenetics and molecular studies in AML,⁷ together with antecedent of myelodysplastic

syndrome, multidrug resistance, or other medical comorbidities⁸ provide important prognostic information.⁷

ALL, the most common form of cancer in children, is a clonal stem cell malignancy of excessive B- or T-lymphoblast proliferation.⁹ The genetics of ALL are quite complex and are comprised of a variety of chromosome fusions, which can be used to distinguish different subtypes of the disease. Treatment for ALL is categorized broadly as induction phase, consolidation therapy, maintenance therapy, central nervous system (CNS) prophylaxis, and allogeneic stem cell transplantation. The goal of induction therapy is to achieve CR. Standard therapy will achieve CR in 80%–90% of patients.⁵

CML is characterized by a balanced genetic translocation, t(9;22)(q34;q11.2), involving a fusion of the *ABL* oncogene from chromosome 9q34 with the *BCR* gene on chromosome 22q11.2. This rearrangement is known as the Philadelphia chromosome. This translocation results in expression of the constitutively active protein tyrosine kinase BCR-ABL.¹⁰ The current standard of care for CML is tyrosine kinase inhibitor (TKI) therapy, a very specific inhibitor of the BCR-ABL fusion protein. Imatinib, a TKI, has revolutionized the treatment of CML by transforming it from an invariably fatal disease to a chronic but manageable condition. Treatment with imatinib results in a 5-year progression-free survival rate of approximately 89%.¹¹ Resistance to imatinib occurs in certain cases, usually through mutations in the imatinib binding site on BCR-ABL, hence, second generation TKIs (dasatinib and nilotinib) were introduced to the pharmacological armamentarium, successfully rescuing about 50% of imatinib-resistant patients.¹²

CLL, the most common type of adult leukemia,¹³ is characterized by the accumulation of mature CD5⁺ B cells in the peripheral blood and lymphoid organs. As in the leukemias described above, chromosomal aberrations and gene mutations are common in CLL. Over the past decades, there has been a transition from single-agent alkylator-based therapies to nucleoside analogues, combinations of both alkylators and nucleoside analogues, and most recently, chemoimmunotherapy. CR rates have improved from 7% to a maximum of 70%.^{14,15}

IL-15

IL-15 was codiscovered in 1994 by two independent groups while studying the human T cell lymphotropic virus-1 (HTLV-1)-infected T-cell line, HUT102, in the absence of IL-2¹⁶ and its ability to stimulate proliferation of the IL-2-dependent CTLL-2 T cell line in the presence of neutralizing anti-IL-2 antibodies.¹⁷ IL-15 is a member of the four

α -helix bundle and shares receptor signaling components (IL-2/15 receptor [R] $\beta\gamma$) with IL-2; as a result, the two cytokines have similar biologic properties in vitro. However, specificity for IL-15 versus IL-2 is provided by unique private α -chain receptors that complete the IL-15R $\alpha\beta\gamma$ and IL-2R $\alpha\beta\gamma$ heterotrimeric high-affinity receptor complexes.¹⁸

IL-15 is a 14–15 kDa glycoprotein encoded by a 34 kb region on human chromosome 4q31 and the central region of mouse chromosome 8.¹⁹ There are two isoforms of IL-15 messenger(m)RNA that differ in their signal peptides lengths, containing either a short signal peptide or long signal peptide (Figure 1). Both isoforms produce the same mature protein; however, they each have distinct intracellular trafficking, localization, and secretion patterns. The IL-15 long signal peptide is located to the Golgi apparatus, early endosomes, and the endoplasmic reticulum and is often secreted from the cell as a soluble protein. The IL-15 short signal peptide is restricted to the cytoplasm and nucleus and may play a role in its transcriptional regulation.²⁰

Although IL-15 mRNA can be found in many tissues and cells, including fibroblasts, muscle cells, keratinocytes, kidney cells, lymphocytes, mast cells, and tumor cells,²¹ it is produced as a mature protein mainly by dendritic cells (DCs), monocytes, macrophages, and stromal cells.²² Translationally inactive IL-15 mRNA is stored in the cell, ready to be rapidly translated upon specific signals.²² The prevailing mechanism of IL-15 action seems to be trans-presentation (juxtacrine signaling) (Figure 1), although it also includes intracrine, autocrine, paracrine, and endocrine signaling.²⁰ IL-15 is also capable of efficiently signaling in cis through IL-15 R α and IL2R β/γ expressed on the surface of a single cell.

Once IL-15 is secreted out of the cell, it binds to IL-15R α and is presented to IL-2R $\beta\gamma$ complexes expressed on nearby effector cells, leading to a series of signaling events. These include activation of the JAK/STAT proteins for cellular activation.²⁴ Binding of IL-15 to the IL-2/15R $\beta\gamma$ heterodimer induces JAK1 activation that subsequently phosphorylates STAT3 via the β -chain and JAK3/STAT5 activation via its γ -chain (Figure 1).²⁴ Additional signaling pathways involve the recruitment of Shc to a phosphorylated site on the IL-2/15R β chain, followed by activation of Grb2. From there, Grb2 can proceed down the PI3K-Akt signaling pathway or can bind the guanine nucleotide exchange factor SOS to activate the RAS-RAF-MAPK signaling pathway.^{25,26} Collectively, these signaling mechanisms induce expression and activation of downstream effector molecules, such as proto-oncogenes *c-Myc*, *c-Fos*, and *c-Jun*, and antiapoptotic protein Bcl-2 for cellular proliferation.²⁷

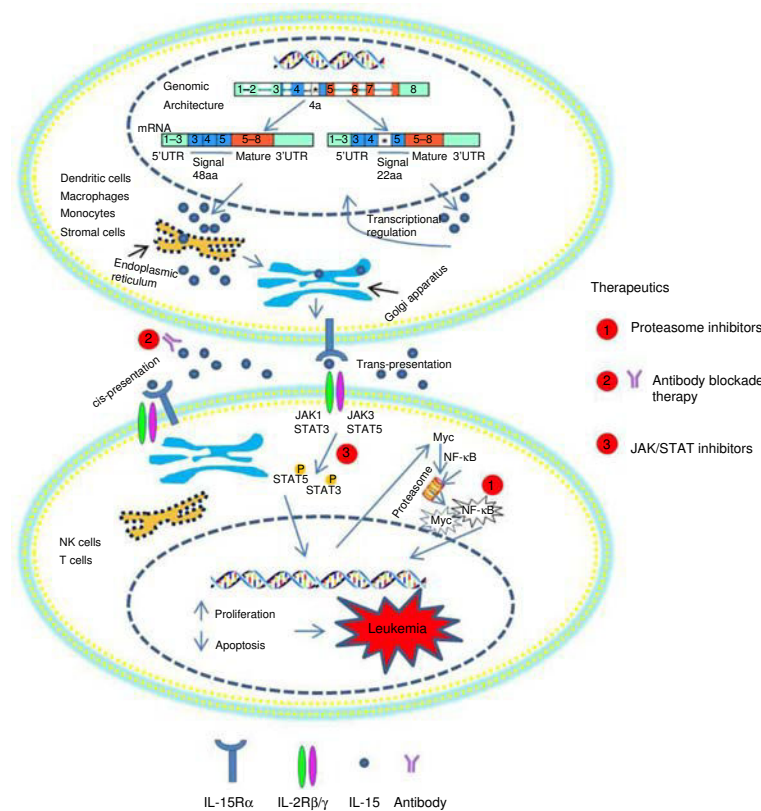


Figure 1 IL-15 expression and its potential for targeting in leukemia. The IL-15 gene is made up of nine exons and eight introns, of which four exons code for the mature protein. Long signal peptide is located to the Golgi apparatus, early endosomes, and the endoplasmic reticulum and is often secreted from the cell as a soluble protein, whereas short signal peptide is restricted to the cytoplasm and nucleus. IL-15R α can transpresent IL-15 to IL-2R β/γ ⁺ NK cells or T-cells through cell contact. The possibility of cis-presentation by a IL-15R α /IL-15 membrane complex to an IL-2R β/γ heterodimer on the same cell is shown. NK cell or T-cell activation can induce JAK/STAT activation. The phosphorylated STAT proteins form then a heterodimer and traffic to the nucleus, activating transcription factors which contribute to cell survival. Therapeutic interventions for targeting IL-15 include: proteasomal inhibitors, anti-IL-15 receptor antibody, and pharmacologic inhibitors.

Abbreviations: IL, interleukin; mRNA, messenger RNA.

IL-15 plays an important role in the development, homeostasis, and function of memory CD8⁺ T cells, natural killer (NK) cells, NKT cells, and intestinal intraepithelial T cells.^{28,29} This cytokine induces proliferation of naïve CD8⁺ and memory CD4⁺ and CD8⁺ T cells, promoting development of the primary response of effector CD8⁺ T cells,³⁰ and makes both CD4⁺ and CD8⁺ T cells resistant to the action of regulatory T cells.³¹ IL-15, which is itself produced by DCs, participates in their activation, proliferation, and differentiation,³² promoting expression of major histocompatibility complex (MHC) class II, CD40, and CD80/86 molecules,³³ and making them potent inducers of CD4⁺ and CD8⁺ T cell responses.³⁴ More importantly, it inhibits IL-2-induced activation-induced cell death.³⁵ The antiapoptotic effects of IL-15 in granulocytes and lymphocytes are caused by its regulatory actions on the expression of proteins of the Bcl-2 family and on the activity of NF- κ B and caspases.³⁶ IL-15 induces proliferation and promotes cell survival of human T and B lymphocytes, and NK cells. However, it may also play a role in certain leukemias: human lymphotropic virus type-1 (HTLV-1)-associated adult T cell leukemia (ATL),

large granular lymphocyte (LGL) leukemia, ALL, AML, B-cell CLL, and CML (Figure 1).

Role of IL-15 in leukemias HTLV-1-associated ATL

Both IL-15 and IL-15R α levels are elevated in ATL patients.^{37,38} Using an antibody towards IL-2/IL-15R, Azimi et al³⁷ demonstrated a role of this cytokine in the proliferation of peripheral mononuclear cells of infected patients. In these patients, an elevation of IL-15 mRNA was also detected. This phenomenon was also confirmed in another study, where an increase of IL-15R α , IL-15 mRNA and protein level was detected in HTLV-1-associated diseases. Furthermore, researchers observed that the viral protein Tax was involved in the activation of IL-15R α . These findings suggest a role for IL-15R α in the aberrant T cell proliferation observed in HTLV-1-associated diseases. Other studies have observed that the mechanism of HTLV-1 oncogenesis relies on a constitutive activation of the JAK/STAT pathway, especially on an association between JAK1 and STAT3, two molecules that are downstream to the IL-2/IL-15 receptor.³⁹

However, Chung et al observed that IL-13 mRNA was highly expressed in HTLV-1-infected, IL-2-dependent T-cell lines, but IL-4, IL-10, IL-2, or IL-15 mRNAs were either below detection limits or did not correlate with HTLV-1 infection.⁴⁰ These conflicting results may rely on the fact that they were performed on different biological samples. Further studies on the role of IL-15 in ATL patients are warranted to determine definitively whether IL-15 may participate in the initiation, maintenance, or progression of the disease.

LGL leukemia

LGL leukemia can arise from a CD3⁺ T-cell lineage or from a CD3⁻ NK-cell lineage, which can be classified into two categories: NK LGL leukemia and chronic NK lymphocytosis.⁴¹ In a study where they deciphered the role of IL-15 in LGL, Zambello et al demonstrated the presence of IL-15 on leukemic LGL blasts, suggested a role of IL-15 in the pathogenesis of this disease, and showed that IL-15 may induce proliferation and cytotoxicity of LGL through the β and γ chains shared with IL-2.⁴² The study of Chen et al showed increased expression of IL-15R α in T-cell LGL (T-LGL) leukemia and suggested that higher IL-15R α expression may lower the IL-15 response threshold in vivo and therefore, may contribute to the pathogenesis of the disease.⁴³ Chronic IL-15-mediated activation via the JAK/STAT pathway, especially STAT3 and STAT5, can be leukemogenic.⁴⁴ Somatic mutations in the SH2 domain of *STAT3* have been discovered at the frequency of 40% in T-LGL leukemia and 30% in NK-LGL leukemia patients.^{45,46} Mishra et al showed that excessive IL-15 initiates cancer through the induction of *Myc*, *Hdac-1*, and *NF- κ Bp65*, which mediate downregulation of microRNA (miR)-29b and consequent overexpression of *Dnmt3b*, thereby hastening the onset of LGL leukemia.⁴⁷ Hodge et al demonstrated that IL-15 alters expression of Bcl-2 family members and control of Bid that potentially links this cytokine to leukemogenesis through targeted proteasome degradation of Bid and offers the possibility that proteasome inhibitors may aid in the treatment of LGL leukemia.³⁶ Yu et al demonstrated T-LGL leukemias in IL-15 transgenic mice that expressed NKp46; NKp46-expression was the hallmark of a minute population of wild-type NKT cells with higher activity and potency to become leukemic.⁴⁸ Taken together, all these studies showed a role of IL-15 receptor and its signaling pathway in the pathogenesis of LGL leukemia and suggest that these may be useful targets in the treatment of patients with T-LGL or NKT leukemia.

AML

Very few studies have been published about the putative role of IL-15 in the development of the disease. Physiologically low amounts of IL-15 can be secreted by bone marrow stromal cells.⁴⁹ This suggests that in the pathological condition, IL-15 could play a juxtacrine role, together with other factors, in promoting the survival and proliferation of IL-2R β / γ ⁺ neoplastic clones in the bone marrow or lymph node microenvironment. This is likely to occur more frequently in IL-2R β / γ ⁺ lymphoproliferative disorders;^{50,51} however, it seems that only a fraction of AML express this receptor.⁵² Drexler et al showed that only a fraction (3/19) of a panel of AML cell lines examined displayed responsiveness to IL-15, although the possible involvement of IL-2R β / γ was not studied.⁵³ These results suggested that IL-15, produced by bone marrow stromal cells, could be an antiapoptotic growth factor for a particular subset of AML cells equipped with a functional IL-2R β / γ complex.⁵⁴

ALL

A high expression of IL-15 correlates with CNS disease in childhood ALL^{55,56} and neurocognitive impairment.⁵⁷ Moreover, several *IL-15* single nucleotide polymorphisms (SNPs) have been associated with minimal residual disease;⁵⁸ five SNPs (rs10519612, rs10519613, rs35964658, rs17007695, and rs17015014) located in the *IL-15* locus were associated with childhood ALL treatment response.⁵⁹ In adult ALL, the expression of *IL-15* has also been correlated with the immunophenotypes of ALL, therefore Lin et al genotyped the five SNPs of the *IL-15* gene by polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism assays and observed a excess risk of developing ALL for the rs10519612 CC and rs17007695 TC genotype carriers in the adult Chinese population.⁶⁰ Aly et al also observed a higher risk of developing T-cell ALL for rs10519612 CC and an increased risk of developing B-cell ALL for rs17007695 TC and rs17007695 CC genotype carriers in Egypt.⁶¹ These results suggested that several IL-15 SNPs, which were associated with minimal residual disease and correlated with the immunophenotypes of ALL, may provide important prognostic information in ALL patients.

CML

Autologous transplantation of stem cells could represent an alternative treatment to allogeneic bone marrow transplantation for CML patients, in whom NK cells may constitute the main cytolytic immune cells effect of mediating the graft-versus-leukemia effect.⁶² Therefore, Carayol et al investigated

NK cell differentiation of CD34⁺ progenitors from CML patients and found that CD34⁺ cells from CML patients did not proliferate nor differentiate in the presence of stem cell factor and IL-15. Furthermore, anti-IL-15 monoclonal antibody (mAb) failed to induce the downregulation of the γ c chain or the disruption of its interaction with JAK3 in leukemic cells. Therefore, in leukemic cells, the constitutive expression of the γ c chain, as well as the continuous production of IL-15, would explain the sustained proliferation of leukemic precursors in vivo and their survival. As all the patients included in this study were positive for *BCR/ABL*, the alteration of the IL-15 differentiation pathway could be an indirect consequence of the *BCR/ABL* protein expression and its subsequent enhanced tyrosine kinase activity.⁶³ In this respect, *BCR/ABL* expression through NF- κ B activation⁶⁴ may be involved in IL-15 transcription,⁶⁵ thus the IL-15 signaling pathway may play a role in the development and progression of CML.

CLL

Purified CLL cells do not proliferate and tend to undergo spontaneous apoptosis in vitro, suggesting that factors inducing CLL cell survival and proliferation might be present in the microenvironment of lymphoid organs or of the bone marrow.⁶⁶ Several cytokines, such as the TNF family members BAFF and APRIL,⁶⁷ the chemokine SDF-1,⁶⁸ IL-2,⁶⁹ and IL-15,⁷⁰ stimulate CLL cell proliferation and/or survival in vitro. Bernasconi et al demonstrated that IL-15 and CpG oligonucleotides promote memory B-cell activation and proliferation,⁷¹ and Park et al suggested that IL-15 plays an important role in supporting germinal center B cell proliferation, proposing a new target for treatment of B cell tumors.⁷² Importantly, IL-15 has also been described as a growth factor in non-germinal center-derived CLL mature B-cell survival and proliferation, through a strong activation of both STAT5 and ERK1/2 pathways.⁷³ Interestingly, the mitogenic and antiapoptotic effects of IL-15 were enhanced when CLL B cells were preactivated by CD40. Epron et al found that in the presence of CD40L signaling, IL-15 essentially increased B-cell proliferation.⁷⁴ These studies demonstrated that the IL-15 signaling pathway plays a role in CLL cell survival and proliferation and that the cooperation between IL-15 and CD40L increased CLL B cell growth.

Critical analysis of the potential for targeting IL-15 in cancer

Therapeutic interventions of targeting IL-15 have been found to include: proteasomal inhibitors,⁴⁵ anti-IL-15R antibodies and pharmacologic inhibitors (Figure 1).⁷⁵

IL-15 can lower the proapoptotic Bid protein in LGL leukemia, which was shown to result from increased proteasomal degradation, whereas the induction of Bid by the proteasome inhibitor bortezomib increased leukemic cell death, suggesting that proteasome inhibitors could be an effective treatment option for this disease.³⁶ Furthermore, a formulation of a proteasomal inhibitors provides long-term disease-free survival in leukemic mice,⁴⁹ thus offering a new approach to treating patients with aggressive LGL leukemia.

Another therapeutic approach targeting IL-15 in leukemias has been the use of the anti-IL-15R mAb Mik β 1 to block the presentation of IL-15 to the IL-2/IL-15R β , thereby inhibiting proliferation of IL-15-dependent leukemia cells (Table 1).⁷⁶ A Phase I clinical trial of IL-15 blockade in T-cell LGL leukemia was conducted by Waldmann et al using the Hu-Mik β 1 mAb that blocks IL-15 transpresentation to cells expressing IL-2/IL-15R β and γ c (Table 1).⁷⁶ However, Hu-Mik β 1 did not block IL-15 action on the cells that express the heterotrimeric receptor in a cis orientation. In this trial, Hu-Mik β 1 therapy was not effective in the treatment of patients with monoclonal T-LGL.

Finally, Epling-Burnette et al demonstrated that STAT3 activation contributed to accumulation of the leukemic LGL clones, as a variety of STAT3 inhibitors come forth to the clinic, suggested that investigation could focus on STAT3 inhibitors in the treatment of LGL leukemia.⁷⁷

However, IL-15 can activate many immune antitumor mechanisms and can be considered as a good candidate for application in tumor therapy. The most important cells engaged in IL-15 antitumor activity seem to be T-cells, in particular CD8⁺ T cytotoxic cells and NK cells.²²

IL-15 increases the number of specific CD8 T cells in adoptive T-cell therapy,⁷⁸ and in vitro assays have shown that treatment of CML monocytes with IFN- α and GM-CSF resulted in the rapid generation of activated DCs expressing IL-15. An additional activation/maturation step of these DCs can render these cells fully capable of presenting CML-specific antigens inducing tumor-specific CD8⁺ effector cells, which represents an important requisite for achieving an immune-mediated control of tumor progression in CML patients.^{79–81}

It had been proved that IL-15 increases NK cell cytotoxicity in an NKG2D-dependent fashion,⁸² which could be dependent on the presence of the NKG2D ligand ULBP1 on the tumor cell,⁸³ and that IL-15-expanded NK cells enhanced their expression of KIR and NKG2D.⁸⁴ Furthermore, IL-15 may be used in NK cell expansion protocols, in combination with SCF, FLT3-L, and IL-21, to generate NK cells from CD34⁺ cells. This protocol was developed by Yoon et al to expanded NK cells into AML or ALL patients shortly after

Table 1 Clinical trials of targeting IL-15 in cancer

Clinical trial	Trial type	Agents	Disease	Effect of IL-15
Phase I trial of IL-15 trans presentation blockade using humanized Mik β -I mAb in patients with T-cell LGL	Cancer immunotherapy	Anti-IL15 antibody Mik β -I mAb	LGL	Harmful
Recombinant Interleukin-15 in Treating Patients With Advanced Melanoma, Kidney Cancer, Non-Small Cell Lung Cancer, or Squamous Cell Head and Neck Cancer NCT01727076	Cancer immunotherapy	IL-15	Melanoma, kidney cancer, non-small cell-lung cancer, or squamous cell head and neck cancer	Beneficial
Use of IL-15 After Chemotherapy and Lymphocyte Transfer in Metastatic Melanoma NCT01369888	Cancer immunotherapy (adjuvant)	Tumor-infiltrating lymphocytes, IL-15	Melanoma	Beneficial
A Phase I Study of Intravenous Recombinant Human IL-15 in Adults With Refractory Metastatic Malignant Melanoma and Metastatic Renal Cell Cancer NCT01021059	Cancer immunotherapy	IL-15	Melanoma or renal cell cancer	Beneficial
Continuous Infusion of rhIL-15 for Adults With Advanced Cancer NCT01572493	Cancer immunotherapy	IL-15	Carcinoma or lymphoma	Beneficial
Haploidentical Stem Cell Transplantation and IL-15 NK Cell Infusion for Pediatric Refractory Solid Tumors NCT01337544	Cancer immunotherapy	HSCT, NK cells grown in culture with IL-15 (ancillary agent)	Pediatric solid tumors	Beneficial
IL-15 Super Agonist ALT-803 to Treat Relapse Of Hematologic Malignancy After Allogeneic SCT NCT01885897	Cancer immunotherapy (after SCT)	IL-15 super agonist	Relapse of hematologic malignancy	Beneficial
NK White Blood Cells and Interleukin in Children and Young Adults With Advanced Solid Tumors NCT01875601	Cancer immunotherapy	NK cells, IL-15	Solid tumors, brain tumors, sarcoma, Wilm's tumor, or rhabdomyosarcoma	Beneficial
Haploidentical Donor Natural Killer Cell Infusion With IL-15 in Acute Myelogenous Leukemia (AML) NCT01385423	Cancer immunotherapy	NK cells, IL-15	Acute myelogenous leukemia, myelodysplastic syndrome	Beneficial
A Phase I Study of the Clinical and Immunologic Effects of ALT-803 in Patients With Advanced Melanoma NCT1946789	Cancer immunotherapy	IL-15 super agonist	Melanoma	Beneficial
IL15 Dendritic Cell Vaccine for Patients With Resected Stage III (A, B or C) or Stage IV Melanoma NCT1189383	Cancer vaccine	Dendritic cells grown in culture with IL-15 (ancillary agent)	Melanoma	Beneficial
A Study of Intravesical Bacillus Calmette-Guerin (BCG) in Combination With ALT-803 in Patients With BCG-naive Non-Muscle Invasive Bladder Cancer NCT02138734	Cancer immunotherapy	IL-15 super agonist	Bladder cancer	Beneficial
A Study of ALT-803 in Patients With Relapsed or Refractory Multiple Myeloma NCT02099539	Cancer immunotherapy	IL-15 super agonist	Multiple myeloma	Beneficial
Natural Killer Cells in Acute Leukemia and Myelodysplastic Syndrome NCT02123836	Cancer immunotherapy	NK cells expanded with K562-mb15-41BBL (ancillary agent)	Acute leukemia or myelodysplastic syndrome	Beneficial

Abbreviations: HSCT, haploidentical stem cell transplantation; K562-mb15-41BBL, irradiated K562 cell line modified to express membrane-bound IL-15 and 41BB ligand; LGL, large granular lymphocyte leukemia; mAb, monoclonal antibody; NCT, National Clinical Trial; SCT, stem cell transplantation.

haploidentical stem cell transplantation. This feasibility study showed no toxicity of the NK cell infusion.⁸⁵

There are additional ways in which NK cells are important for IL-15 antitumoral therapy. For instance, in vitro assays

have indicated that NK cells in the presence of IL-15 become more efficacious mediators of ADCC against cultures of B-lymphoma cells in the presence of the anti-CD20 mAb rituximab.⁸⁶

The encouraging data of IL-15 immunotherapy in murine models, together with its low toxicity in mice and primates, has led to the design of clinical trials in cancer patients. The first-in-human clinical trial of recombinant human IL-15 (rhIL-15) in patients with cancer, by Conlon et al, demonstrated that IL-15 could be safely administered to patients with metastatic malignancy. IL-15 administration markedly altered homeostasis of NK cells and $\gamma\delta$ cells in the blood.⁸⁷ There were also other clinical trials initiated recently, as shown in Table 1. Six of the trials use the rhIL-15 protein, administered either alone or combined with the administration of patient-derived tumor-infiltrating lymphocyte or combined with NK cells. Three trials used IL-15 as an ex vivo ancillary agent to enhance DC or NK cell expansion and function when used for anticancer vaccination or immunotherapy. The remaining four trials aimed to determine the safety and effectiveness of an IL-15 super agonist complex (ALT-803) administered weekly for 4 or 6 consecutive weeks, alone or mixed together with Calmette-Guerin bacillus.

Conclusion

The recent published data have highlighted the role of IL-15 and the aberrancies in its regulation in the development and progression of leukemias. The better understanding of the IL-15/IL-15R system has led to the identification of new therapeutic targets, which will open the possibility for the development of new drugs. However, IL-15's ability to stimulate the development and activity of effector and memory CD8⁺ T cells, and NK and NKT cells, which all contribute significantly to the antitumor immune response, raises the hope that this cytokine could become a valuable adjuvant in antitumor immunotherapy.

Acknowledgments

This study was supported by an Oversea Study Fellowship from the People's Republic of China Scholarship Council.

Disclosure

The authors report no conflicts of interest in this work.

References

- Ntziachristos P, Mullenders J, Trimarchi T, Aifantis I. Mechanisms of epigenetic regulation of leukemia onset and progression. *Adv Immunol*. 2013;117:1–38.
- Ferrara F, Schiffer CA. Acute myeloid leukaemia in adults. *Lancet*. 2013;381(9865):484–495.
- de Jonge HJ, Huls G, de Bont ES. Gene expression profiling in acute myeloid leukaemia. *The Netherlands Journal of Medicine*. 2011;69:167–176.
- Roboz GJ. Current treatment of acute myeloid leukemia. *Curr Opin Oncol*. 2012;24(6):711–719.
- Dis Mon*. 2012;58:219–238.
- Breems DA, Van Putten WL, Huijgens PC, et al. Prognostic index for adult patients with acute myeloid leukemia in first relapse. *J Clin Oncol*. 2005;23(9):1969–1978.
- Patel JP, Gönen M, Figueroa ME, et al. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2012;366(12):1079–1089.
- Appelbaum FR, Gundacker H, Head DR, et al. Age and acute myeloid leukemia. *Blood*. 2006;107(9):3481–3485.
- Pui CH, Evans WE. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *New Engl J Med*. 2006;354(2):166–178.
- Druker BJ. Translation of the Philadelphia chromosome into therapy for CML. *Blood*. 2008;112(13):4808–4817.
- Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, et al; IRIS Investigators. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2006;355(23):2408–2417.
- Holtz MS, Forman SJ, Bhatia R. Nonproliferating CML CD34+ progenitors are resistant to apoptosis induced by a wide range of proapoptotic stimuli. *Leukemia*. 2005;19(6):1034–1041.
- Cramer P, Hallek M. Hematological cancer in 2011: New therapeutic targets and treatment strategies. *Nat Rev Clin Oncol*. 2012;9(2):72–74.
- Catovsky D, Richards S, Matutes E, et al; UK National Cancer Research Institute (NCRI) Haematological Oncology Clinical Studies Group; NCRI Chronic Lymphocytic Leukaemia Working Group. Assessment of fludarabine plus cyclophosphamide for patients with chronic lymphocytic leukaemia (the LRF CLL4 Trial): a randomised controlled trial. *Lancet*. 2007;370(9583):230–239.
- Keating MJ, O'Brien S, Albitar M, et al. Early results of a chemoinmunotherapy regimen of fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab as initial therapy for chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2005;23(18):4079–4088.
- Bamford RN, Grant AJ, Burton JD, et al. The interleukin (IL) 2 receptor beta chain is shared by IL-2 and a cytokine, provisionally designated IL-T, that stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(11):4940–4944.
- Grabstein KH, Eisenman J, Shanebeck K, et al. Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor. *Science*. 1994;264(5161):965–968.
- Fehniger TA, Caligiuri MA. Interleukin 15: biology and relevance to human disease. *Blood*. 2001;97(1):14–32.
- Steel JC, Waldmann TA, Morris JC. Interleukin-15 biology and its therapeutic implications in cancer. *Trends Pharmacol Sci*. 2012;33(1):35–41.
- Tagaya Y, Kurys G, Thies TA, et al. Generation of secretable and nonsecretable interleukin 15 isoforms through alternate usage of signal peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(26):14444–14449.
- Bulfone-Paus S, Bulanova E, Budagian V, Paus R. The interleukin-15/interleukin-15 receptor system as a model for juxtacrine and reverse signaling. *Bioessays*. 2006;28(4):362–377.
- Jakobisiak M, Golab J, Lasek W. Interleukin 15 as a promising candidate for tumor immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2011;22(2):99–108.
- Olsen SK, Ota N, Kishishita S, et al. Crystal structure of the interleukin-15. interleukin-15 receptor alpha complex: insights into trans and cis presentation. *J Biol Chem*. 2007;282(51):37191–37204.
- Johnston JA, Bacon CM, Finbloom DS, et al. Tyrosine phosphorylation and activation of STAT5, STAT3, and Janus kinases by interleukins 2 and 15. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(19):8705–8709.
- Gu H, Maeda H, Moon JJ, et al. New role for Shc in activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Mol Cell Biol*. 2000;20(19):7109–7120.
- Adunyah SE, Wheeler BJ, Cooper RS. Evidence for the involvement of LCK and MAP kinase (ERK-1) in the signal transduction mechanism of interleukin-15. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;232(3):754–758.
- Miyazaki T, Liu ZJ, Kawahara A, et al. Three distinct IL-2 signaling pathways mediated by bcl-2, c-myc, and lck cooperate in hematopoietic cell proliferation. *Cell*. 1995;81(2):223–231.

28. Waldmann TA. The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(8):595–601.
29. Imamura M, Shook D, Kamiya T, et al. Autonomous growth and increased cytotoxicity of natural killer cells expressing membrane-bound interleukin-15. *Blood*. 2014;124(7):1081–1088.
30. Stoklasek TA, Schluns KS, Lefrançois L. Combined IL-15/IL-15Ralpha immunotherapy maximizes IL-15 activity in vivo. *J Immunol*. 2006;177(9):6072–6080.
31. Ben Ahmed M, Belhadj Hmida N, Moes N, et al. IL-15 renders conventional lymphocytes resistant to suppressive functions of regulatory T cells through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Immunol*. 2009;182(11):6763–6770.
32. Gil M, Park SJ, Chung YS, Park CS. Interleukin-15 enhances proliferation and chemokine secretion of human follicular dendritic cells. *Immunology*. 2010;130(4):536–544.
33. Mattei F, Schiavoni G, Belardelli F, Tough DF. IL-15 is expressed by dendritic cells in response to type I IFN, double-stranded RNA, or lipopolysaccharide and promotes dendritic cell activation. *J Immunol*. 2001;167(3):1179–1187.
34. Pulendran B, Dillon S, Joseph C, Curiel T, Banchereau J, Mohamadzadeh M. Dendritic cells generated in the presence of GM-CSF plus IL-15 prime potent CD8+ Tc1 responses in vivo. *Eur J Immunol*. 2004;34(1):66–73.
35. Waldmann T. The contrasting roles of IL-2 and IL-15 in the life and death of lymphocytes: implications for the immunotherapy of rheumatological diseases. *Arthritis Res*. 2002;4 Suppl 3:S161–S167.
36. Hodge DL, Yang J, Buschman MD, et al. Interleukin-15 enhances proteasomal degradation of bid in normal lymphocytes: implications for large granular lymphocyte leukemias. *Cancer Res*. 2009;69(9):3986–3994.
37. Azimi N, Jacobson S, Leist T, Waldmann TA. Involvement of IL-15 in the pathogenesis of human T lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: implications for therapy with a monoclonal antibody directed to the IL-2/15R beta receptor. *J Immunol*. 1999;163(7):4064–4072.
38. Mariner JM, Lantz V, Waldmann TA, Azimi N. Human T cell lymphotropic virus type I Tax activates IL-15R alpha gene expression through an NF-kappa B site. *J Immunol*. 2001;166(4):2602–2609.
39. Takemoto S, Mulloy JC, Cereseto A, et al. Proliferation of adult T cell leukemia/lymphoma cells is associated with the constitutive activation of JAK/STAT proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(25):13897–13902.
40. Chung HK, Young HA, Goon PK, et al. Activation of interleukin-13 expression in T cells from HTLV-1-infected individuals and in chronically infected cell lines. *Blood*. 2003;102(12):4130–4136.
41. Lamy T, Loughran TP. Current concepts: large granular lymphocyte leukemia. *Blood Rev*. 1999;13(4):230–240.
42. Zambello R, Facco M, Trentin L, et al. Interleukin-15 triggers the proliferation and cytotoxicity of granular lymphocytes in patients with lymphoproliferative disease of granular lymphocytes. *Blood*. 1997;89(1):201–211.
43. Chen J, Petrus M, Bamford R, et al. Increased serum soluble IL-15R α levels in T-cell large granular lymphocyte leukemia. *Blood*. 2012;119(1):137–143.
44. Mishra A, Sullivan L, Caligiuri MA. Molecular pathways: interleukin-15 signaling in health and in cancer. *Clin Cancer Res*. 2014;20(8):2044–2050.
45. Koskela HL, Eldfors S, Ellonen P, et al. Somatic STAT3 mutations in large granular lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2012;366(20):1905–1913.
46. Jerez A, Clemente MJ, Makishima H, et al. STAT3 mutations unify the pathogenesis of chronic lymphoproliferative disorders of NK cells and T-cell large granular lymphocyte leukemia. *Blood*. 2012;120(15):3048–3057.
47. Mishra A, Liu S, Sams GH, et al. Aberrant overexpression of IL-15 initiates large granular lymphocyte leukemia through chromosomal instability and DNA hypermethylation. *Cancer Cell*. 2012;22(5):645–655.
48. Yu J, Mitsui T, Wei M, et al. Nkp46 identifies an NKT cell subset susceptible to leukemic transformation in mouse and human. *J Clin Invest*. 2011;121(4):1456–1470.
49. Mrózek E, Anderson P, Caligiuri MA. Role of interleukin-15 in the development of human CD56+ natural killer cells from CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood*. 1996;87(7):2632–2640.
50. Trentin L, Cerruti A, Zambello R, et al. Interleukin-15 promotes the growth of leukemic cells of patients with B-cell chronic lymphoproliferative disorders. *Blood*. 1996;87(8):3327–3336.
51. Zambello R, Facco M, Trentin L, et al. Interleukin-15 triggers the proliferation and cytotoxicity of granular lymphocytes in patients with lymphoproliferative disease of granular lymphocytes. *Blood*. 1997;89(1):201–211.
52. Rosolen A, Nakanishi M, Poplack DG, et al. Expression of interleukin-2 receptor beta subunit in hematopoietic malignancies. *Blood*. 1989;73(7):1968–1972.
53. Drexler HG, Zaborski M, Quentmeier H. Cytokine response profiles of human myeloid factor-dependent leukemia cell lines. *Leukemia*. 1997;11(5):701–708.
54. Meazza R, Basso S, Gaggero A, et al. Interleukin (IL)-15 induces survival and proliferation of the growth factor-dependent acute myeloid leukemia M-07e through the IL-2 receptor beta/gamma. *Int J Cancer*. 1998;78(2):189–195.
55. Cario G, Izraeli S, Teichert A, et al. High interleukin-15 expression characterizes childhood acute lymphoblastic leukemia with involvement of the CNS. *J Clin Oncol*. 2007;25(30):4813–4820.
56. Williams MT, Yousafzai Y, Cox C, et al. Interleukin-15 enhances cellular proliferation and upregulates CNS homing molecules in pre-B acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2014;123(20):3116–3127.
57. Petranovic D, Pilcic G, Valkovic T, Sotosek Tokmadzic V, Laskarin G. Perforin- and granulysin-mediated cytotoxicity and interleukin 15 play roles in neurocognitive impairment in patients with acute lymphoblastic leukaemia. *Med Hypotheses*. 2014;83(1):122–126.
58. Zhang XJ, Yan KL, Wang ZM, et al. Polymorphisms in interleukin-15 gene on chromosome 4q31.2 are associated with psoriasis vulgaris in Chinese population. *J Invest Dermatol*. 2007;127(11):2544–2551.
59. Yang JJ, Cheng C, Yang W, et al. Genome-wide interrogation of germline genetic variation associated with treatment response in childhood acute lymphoblastic leukemia. *JAMA*. 2009;301(4):393–403.
60. Lin D, Liu C, Xue M, et al. The role of interleukin-15 polymorphisms in adult acute lymphoblastic leukemia. *PLoS One*. 2010;5(10):e13626.
61. Aly RM, Taalab MM, Ghazy HF. Influence of interleukin-15 polymorphism on the survival of adult patients with acute lymphoblastic leukaemia in Egypt. *Leuk Lymphoma*. Epub June 17, 2014.
62. Carella AM, Lerma E, Corsetti MT, et al. Autografting with Philadelphia chromosome-negative mobilized hematopoietic progenitor cells in chronic myelogenous leukemia. *Blood*. 1999;93(5):1534–1539.
63. Carayol G, Giron-Michel J, Azzarone B, et al. Altered natural killer cell differentiation in CD34+ progenitors from chronic myeloid leukemia patients. *Oncogene*. 2000;19(23):2758–2766.
64. Reuther JY, Reuther GW, Cortez D, Pendergast AM, Baldwin AS. A requirement for NF-kappaB activation in Bcr-Abl-mediated transformation. *Genes Dev*. 1998;12(7):968–981.
65. Washizu J, Nishimura H, Nakamura N, Nimura Y, Yoshikai Y. The NF-kappaB binding site is essential for transcriptional activation of the IL-15 gene. *Immunogenetics*. 1998;48(1):1–7.
66. Ghia P, Circosta P, Scielzo C, et al. Differential effects on CLL cell survival exerted by different microenvironmental elements. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2005;294:135–145.
67. Nishio M, Endo T, Tsukada N, et al. Nurselike cells express BAFF and APRIL, which can promote survival of chronic lymphocytic leukemia cells via a paracrine pathway distinct from that of SDF-1alpha. *Blood*. 2005;106(3):1012–1020.
68. Burger JA, Tsukada N, Burger M, Zvaifler NJ, Dell'Aquila M, Kipps TJ. Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. *Blood*. 2000;96(8):2655–2663.

69. de Toter D, Francia di Celle P, Cignetti A, Foa R. The IL-2 receptor complex: expression and function on normal and leukemic B cells. *Leukemia*. 1995;9(9):1425–1431.
70. Trentin L, Cerutti A, Zambello R, et al. Interleukin-15 promotes the growth of leukemic cells of patients with B-cell chronic lymphoproliferative disorders. *Blood*. 1996;87(8):3327–3335.
71. Bernasconi NL, Traggiai E, Lanzavecchia A. Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. *Science*. 2002;298(5601):2199–2202.
72. Park CS, Yoon SO, Armitage RJ, Choi YS. Follicular dendritic cells produce IL-15 that enhances germinal center B cell proliferation in membrane-bound form. *J Immunol*. 2004;173(11):6676–6683.
73. de Toter D, Meazza R, Capaia M, et al. The opposite effects of IL-15 and IL-21 on CLL B cells correlate with differential activation of the JAK/STAT and ERK1/2 pathways. *Blood*. 2008;111(2):517–524.
74. Epron G, Ame-Thomas P, Le Priol J, et al. Monocytes and T cells cooperate to favor normal and follicular lymphoma B-cell growth: role of IL-15 and CD40L signaling. *Leukemia*. 2012;26(1):139–148.
75. Caceres-Cortes JR. A potent anti-carcinoma and anti-acute myeloblastic leukemia agent, AG490. *Anticancer Agents Med Chem*. 2008;8(7):717–722.
76. Waldmann TA, Conlon KC, Stewart DM, et al. Phase 1 trial of IL-15 trans presentation blockade using humanized Mikβ1 mAb in patients with T-cell large granular lymphocytic leukemia. *Blood*. 2013;121(3):476–484.
77. Epling-Burnette PK, Liu JH, Catlett-Falcone R, et al. Inhibition of STAT3 signaling leads to apoptosis of leukemic large granular lymphocytes and decreased Mcl-1 expression. *J Clin Invest*. 2001;107(3):351–362.
78. Wang X, Berger C, Wong CW, Forman SJ, Riddell SR, Jensen MC. Engraftment of human central memory-derived effector CD8+ T cells in immunodeficient mice. *Blood*. 2011;117(6):1888–1898.
79. Gabriele L, Borghi P, Rozera C, et al. IFN-α 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*. 2004;103(3):980–987.
80. Molldrem JJ, Lee PP, Kant S, et al. Chronic myelogenous leukemia shapes host immunity by selective deletion of high-avidity leukemia-specific T cells. *J Clin Invest*. 2003;111(5):639–647.
81. Schwartz J, Pinilla-Ibarz J, Yuan RR, Scheinberg DA. Novel targeted and immunotherapeutic strategies in chronic myeloid leukemia. *Semin Hematol*. 2003;40(1):87–96.
82. Le Maux Chansac B, Missé D, Richon C, et al. Potentiation of NK cell-mediated cytotoxicity in human lung adenocarcinoma: role of NKG2D-dependent pathway. *Int Immunol*. 2008;20(7):801–810.
83. Sutherland CL, Rabinovich B, Chalupny NJ, Brawand P, Miller R, Cosman D. ULBPs, human ligands of the NKG2D receptor, stimulate tumor immunity with enhancement by IL-15. *Blood*. 2006;108(4):1313–1319.
84. Decot V, Voillard L, Latger-Cannard V, et al. Natural-killer cell amplification for adoptive leukemia relapse immunotherapy: comparison of three cytokines, IL-2, IL-15, or IL-7 and impact on NKG2D, KIR2DL1, and KIR2DL2 expression. *Exp Hematol*. 2010;38(5):351–362.
85. Yoon SR, Lee YS, Yang SH, et al. Generation of donor natural killer cells from CD34(+) progenitor cells and subsequent infusion after HLA-mismatched allogeneic hematopoietic cell transplantation: a feasibility study. *Bone Marrow Transplant*. 2010;45(6):1038–1046.
86. Laprevotte E, Voisin G, Ysebaert L, et al. Recombinant human IL-15 trans-presentation by B leukemic cells from chronic lymphocytic leukemia induces autologous NK cell proliferation leading to improved anti-CD20 immunotherapy. *J Immunol*. 2013;191(7):3634–3640.
87. Conlon KC, Lugli E, Welles HC, et al. Redistribution, hyperproliferation, activation of natural killer cells and CD8 T cells, and cytokine production during first-in-human clinical trial of recombinant human interleukin-15 in patients with cancer. *J Clin Oncol*. 2015;33(1):74–82.

Blood and Lymphatic Cancer: Targets and Therapy

Publish your work in this journal

Blood and Lymphatic Cancer: Targets and Therapy is an international, peer-reviewed, open access journal focusing on blood and lymphatic cancer research, identification of therapeutic targets and the optimal use of preventative and integrated treatment interventions to achieve improved outcomes, enhanced survival and quality of life for the

Submit your manuscript here: <http://www.dovepress.com/blood-and-lymphatic-cancer-targets-and-therapy-journal>

Dovepress

cancer patient. The manuscript management system is completely online and includes a very quick and fair peer-review system. Visit <http://www.dovepress.com/testimonials.php> to read real quotes from published authors.

ORIGINAL ARTICLE

Immunomodulation of endothelial differentiated mesenchymal stromal cells: impact on T and NK cells

Reine El Omar^{1,2}, Yu Xiong^{1,2,3}, Gabriel Dostert^{1,2}, Huguette Louis^{2,4}, Monique Gentils^{1,2}, Patrick Menu^{1,2}, Jean-François Stoltz^{1,2,3}, Émilie Velot^{1,2} and Véronique Decot^{1,2,3}

Wharton's jelly mesenchymal stromal cells (WJ-MSCs) are promising candidates for tissue engineering, as their immunomodulatory activity allows them to escape immune recognition and to suppress several immune cell functions. To date, however, few studies have investigated the effect of differentiation of the MSCs on this immunomodulation. To address this question, we sought to determine the impact of differentiation toward endothelial cells on immunoregulation by WJ-MSCs. Following differentiation, the endothelial-like cells (ELCs) were positive for CD31, vascular endothelial cadherin and vascular endothelial growth factor receptor 2, and able to take up acetylated low-density lipoproteins. The expression of HLA-DR and CD86, which contribute to MSCs immunoprivilege, was still weak after differentiation. We then co-cultured un- and differentiated MSCs with immune cells, under conditions of both direct and indirect contact. The proliferation and phenotype of the immune cells were analyzed and the mediators secreted by both ELCs and WJ-MSCs quantified. Interleukin (IL)-6, IL-1 β , prostaglandin E2 and in particular indoleamine-2,3-dioxygenase expression were upregulated in ELCs on stimulation by T and NK cells, suggesting the possible involvement of these factors in allosuppression. ELCs co-cultured with T cells were able to generate CD25⁺ T cells, which were shown to be of the CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory subset. Direct contact between NK cells and ELCs or WJ-MSCs decreased the level of NK-activating receptor natural-killer group 2, member D. Moreover, direct co-culturing with ELCs stimulates CD73 acquisition on NK cells, a mechanism which may induce adenosine secretion by the cells and lead to an immunosuppressive function. Taken together, our results show that ELCs obtained following differentiation of WJ-MSCs remain largely immunosuppressive.

Immunology and Cell Biology advance online publication, 24 November 2015; doi:10.1038/icb.2015.94

Vascular occlusion remains the leading cause of death in Western countries, despite the availability of several treatments. Among the most widespread is vascular surgery incorporating coronary artery bypass, which requires biologically-responsive vascular substitutes. The shortage of autologous grafts has spurred significant advances in vascular tissue engineering over the last decade. In this context, autologous cells are considered the engineering gold standard, as they are not associated with the immunological and ethical issues of allo- or xenogenic cells. However, autologous cells such as mature endothelial cells (ECs) and smooth muscle cells are inherently heterogeneous and dedifferentiate following prolonged culturing *in vitro*. An attractive alternative is therefore to use allogeneic stem cells, as these boast a high proliferation potential and the ability to differentiate into cells useful for vascular tissue engineering.¹

Mesenchymal stromal cells (MSCs) are multipotent precursors that can be isolated from several tissue sources such as the bone marrow (BM) or adipose tissue and differentiated into multiple lineages under

appropriate induction conditions.² Among the sources of MSCs, Wharton's jelly (WJ), a neonatal connective tissue of the umbilical cord, is among the most promising.³ Notably, WJ-MSCs are more primitive than other MSCs and their use does not trigger ethical controversy. Their significant proliferative potential, differentiation capacity and immunomodulatory properties also make them good candidates for deployment in an allogeneic context. Indeed, MSCs are considered to be 'immunoprivileged cells,' because expression on the cell surface of class II human leukocyte antigen (HLA-II) and co-stimulatory molecules is weak.⁴

MSCs modulate the immune system through several mechanisms. They act as immunosuppressants through release of multiple anti-inflammatory and immune-suppressive factors, inhibiting several functions of diverse immune cells such as T, B, dendritic and natural killer (NK) cells⁵ including proliferation, production of soluble factors and cellular toxicity. They can also modulate the immune response through the generation of regulatory T cells (Tregs).⁶ Immune

¹Université de Lorraine, UMR CNRS 7365, Ingénierie moléculaire et physiopathologie articulaire (IMoPa), Batiment Biopole, Faculté de Médecine, Vandoeuvre-Les-Nancy, France; ²Fédération de Recherche 3209, CNRS-INSERM-Université de Lorraine-CHU, Nancy, France; ³CHU de Nancy, Unité de Thérapie Cellulaire et banque de Tissus, allée du Morvan, Vandoeuvre-Les-Nancy, France and ⁴Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U1116, Faculté de Médecine, Vandoeuvre-Les-Nancy, France

Correspondence: Dr V Decot, Université de Lorraine, UMR CNRS UL 7365, bâtiment Biopole, Faculté de Médecine, 9 av de la Forêt de Haye, Vandoeuvre-Les-Nancy 54505, France.

E-mail: v.decot@chu-nancy.fr

Received 14 November 2014; revised 6 October 2015; accepted 6 October 2015; accepted article preview online 29 October 2015

suppression by MSCs appears to involve both direct cell-to-cell interactions and contact-independent mechanisms such as secretion of soluble factors.⁷ Direct contact immunosuppressive effects appear to be mediated by molecular interactions, which lead to the inhibition of activation signals. Among the immunomodulatory molecules expressed on the surface of MSCs, molecules from the B7 family,⁸ class 1b major histocompatibility complex molecules, CD200 and its receptor CD200R^{9,10} all seem to be involved. Soluble factors including transforming growth factor- β (TGF- β), indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO), interleukins (ILs)-6 and -10, prostaglandin E2 (PGE2), matrix metalloproteinases (MMPs) or adenosine are also under investigation.^{4,11} Specifically, PGE2 and IDO have been shown to inhibit proliferation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) or T cells and appear to be involved in the inhibition of NK cells by downregulating their functional receptors.^{12,13} Notwithstanding these insights, many aspects of MSC immunosuppression remain to be elucidated.

The bulk of studies *in vitro* and *in vivo* on MSC hypoimmunogenicity have been carried out on undifferentiated cells. It is thus of critical interest in regenerative medicine, to determine whether these cells will retain their immunoprivileged and immunomodulatory properties on differentiation into the local cell types at the transplantation site, because allogeneic engineered tissue must be tolerated by the host immune system to remain functional and avoid rejection.

Although numerous studies have investigated the immunological features of BM-MSCs after differentiation into adipose, cartilage or bone cells,^{14,15} neurons¹⁶ or ECs,^{17,18} few have addressed the immunological properties of WJ-MSCs following differentiation.¹⁹ In the present study, we investigated the immunosuppressive and immunoprivileged character of WJ-MSCs after differentiation towards an endothelial phenotype, in order to permit their use in vascular tissue engineering. After 2 weeks of differentiation, co-cultures were then carried out between the resulting endothelial-like cells (ELCs) and PBMCs, T cells or NK cells

Taken together, our data show that WJ-MSCs and their derived ELCs are non-immunogenic and immunosuppressive. Both cell types can impair T cell, can induce the production of Tregs and impair NK-cell functions.

RESULTS

WJ-MSCs acquire endothelial phenotype and function on differentiation

Morphological changes. To confirm their mesenchymal nature before inducing differentiation, WJ-MSCs were immunophenotyped by flow cytometry and found as expected to be positive for expression of CD73, -90 and -105, and negative for CD34 and CD45 (data not shown). Endothelial growth medium-2 (EGM-2) has been shown to induce endothelial differentiation in MSCs.^{20,21} Previous studies in our lab have also demonstrated that poly(allylamine hydrochloride) (PAH) and poly(styrene sulfonate) (PSS) polyelectrolyte multilayer films improve culturing of WJ-MSCs and ECs.^{22,23} We therefore used these two stimuli alone and in combination, to induce endothelial differentiation of WJ-MSCs. The obtained data showed that the differentiation into an endothelial phenotype was induced by cultivating WJ-MSCs at the fourth passage, seeded on (PAH/PSS)₄ film-coated glass slides, in the presence of EGM-2. After 2 weeks of culture, the cells had clearly undergone a distinct morphological change, transforming from a spindle to a caudate or oval shape with eccentric nuclei (Figure 1A (a)). Cells seeded on (PAH/PSS)₄ films or on glass slides in endothelial basal medium-2 (EBM-2), as

well as on glass slides in EGM-2 maintained WJ-MSCs morphology (Figure 1A (b, c and d)).

Phenotype, expression of HLA-DR and CD86. To determine whether expression of WJ-MSCs markers was modified during the differentiation process, expression levels of CD73, -90 and 105 were monitored by flow cytometry at 5, 10 and 15 days of culture. Regarding the mean fluorescence intensity (MFI), an increase of the mesenchymal markers CD90 and CD73 was observed between day 5 and day 15, but those of CD105 showed a drop. The absence of HLA-DR and CD86 (a co-stimulatory molecule that combines with CD28 on T cells during their differentiation) is mainly responsible of MSCs immunoprivilege; thus, we decided to examine the expression of these proteins. Expression of both HLA-DR and CD86 increased to a minor extent in ELCs (HLA-DR MFI: 1.0 ± 0.7 at day 5 to 2.2 ± 1.3 at day 15; CD86 MFI: 0.7 ± 0.6 at day 5 to 1.3 ± 0.4 at day 15; Figure 1B).

Acquisition of endothelial markers and functionality. Expression of endothelial markers CD31, vascular endothelial (VE) cadherin and VE growth factor receptor 2 was evaluated by western blotting. ELCs seeded on films and treated with EGM-2 (Figure 1C, lane c) expressed all of these markers, as did human umbilical vein endothelial cells (HUVECs; Figure 1C, lane b), whereas naive WJ-MSCs were negative (Figure 1C, lane a). No endothelial protein expression was detected when cells were cultured on (PAH/PSS)₄ in EBM-2 (Figure 1C, lane e) or on glass slides either with EGM-2 or EBM-2 (Figure 1C, lane d and f).

We next evaluated the ability to take up acetylated low-density lipoproteins (Ac-LDLs). We observed that differentiated cells also had the ability to incorporate Ac-LDL, a typical function of ECs (Figure 1D (c)) relative to HUVECs. We also investigated the ability of the ELCs to undergo angiogenesis. Indeed, differentiated cells cultured with growth factors on polyelectrolyte multilayer films formed a capillary network (Figure 1E (a and b)) similar to that produced by HUVECs (Figure 1E (c and d)). On the contrary, undifferentiated WJ-MSCs failed to form capillary-like structures (Figure 1E (e and f)).

ELCs do not stimulate proliferation of allogeneic PBMCs and inhibit the proliferation of mitogen-stimulated PBMCs

Several studies have reported that MSC-mediated immunosuppression involves both cell contact-dependent and -independent mechanisms, with the latter likely mediated via release of soluble factors.²⁴ In order to probe the role of cell contact in ELCs immunomodulation, experiments were performed with and without a Transwell (TW) that prevented direct contact between the two cell populations.

To address whether ELCs could act as antigen-presenting cells and stimulate the proliferation of PBMCs, the cells were incubated with an equal number of non-activated PBMCs for 3 days either with or without cell contact, in a one-way mixed lymphocyte reaction assay. As shown in Figure 2a upper graph, ELCs and WJ-MSCs significantly suppressed the proliferation of PBMCs (respectively 0.13 ± 0.006 and 0.16 ± 0.03 versus $0.4 \pm 0.04 \mu\text{g ml}^{-1}$ for PBMCs alone; $P < 0.05$) and this effect was mainly observed when cells were cultured in direct contact.

In another set of experiments, we investigated whether ELCs can inhibit the proliferation of mitogen-stimulated PBMCs (Figure 2a, lower graph). For this, ELCs were incubated with equal number of PBMCs in the presence of phytohemagglutinin (PHA) for 3 days, with the proliferation of PBMCs stimulated with PHA serving as a positive control. The obtained data show, first, that the ELCs significantly

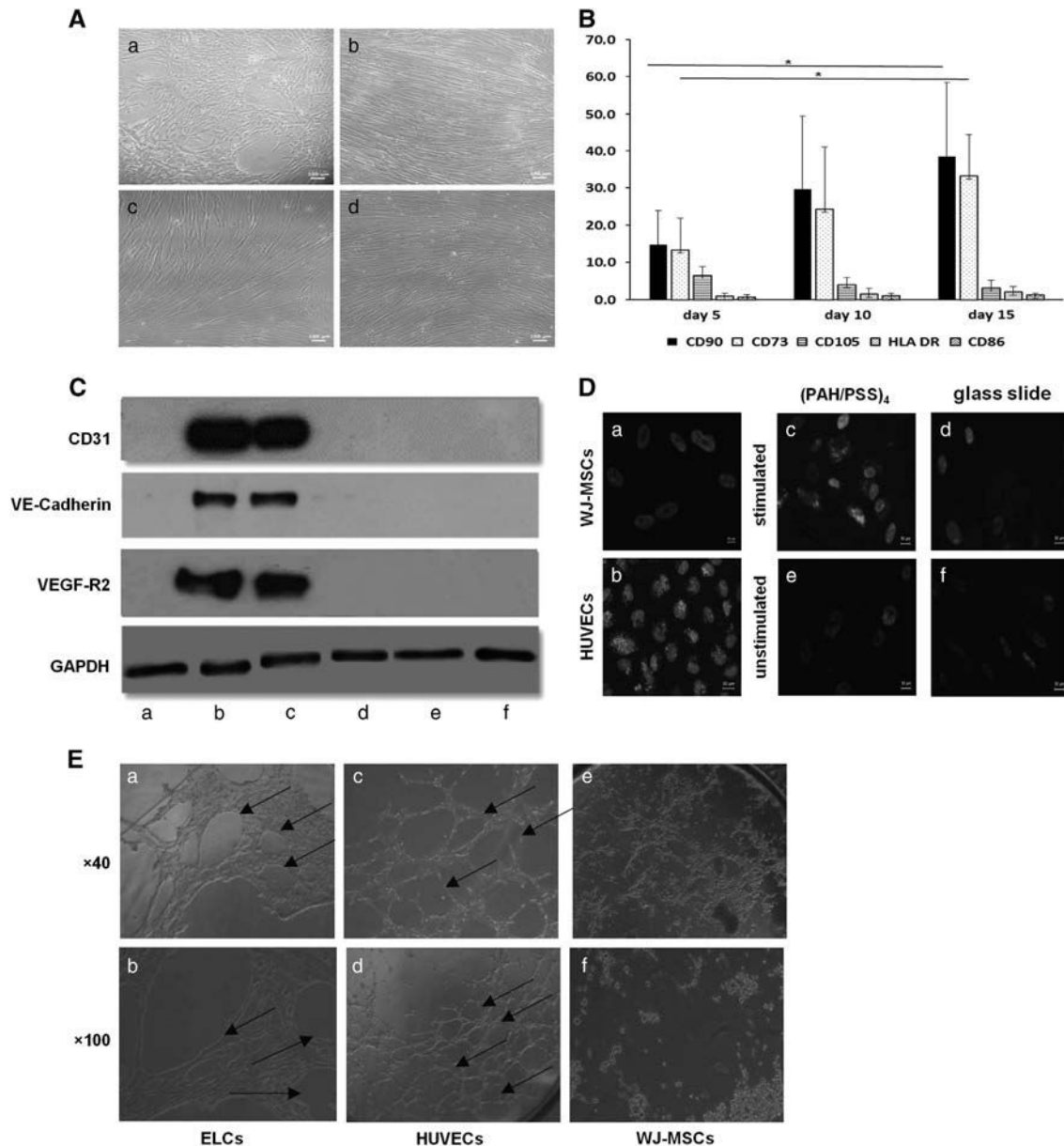


Figure 1 WJ-MSCs change morphology and phenotype on endothelial differentiation, take up Ac-LDL and form tubular structures. **(A)** EGM-2 stimulated (a and b) and unstimulated (c and d) WJ-MSCs morphology on (PAH/PSS)₄-coated glass slides (a and c) and on uncoated glass slides (b and d) was observed by inverted optical microscopy (Nikon Diaphot, UFX-DX, Japan; ×10 magnification; scale bar=100 μm). Only EGM-2 stimulated WJ-MSCs (a) showed a slight morphological evolution from fibroblastic to polygonal shape. **(B)** Expression of three mesenchymal markers (CD73, CD90 and CD105) and two immune markers (HLA-DR and CD86) was evaluated after 5, 10 and 15 days of differentiation by flow cytometry. Marker expression was determined for WJ-MSCs seeded on (PAH/PSS)₄ films and differentiated in EGM-2. Data represent the MFI of expression of each markers from three independent experiments. Error bars indicate s.e.m. **(C)** The expression of CD31, VE-cadherin and VE growth factor receptor 2 (VEGF-R2) by cells cultured under the four conditions (d–e) was determined by western blotting: (a) WJ-MSCs (negative control); (b) endothelial cells extracted from human vein umbilical cord (HUVECs) (positive control); (c) EGM-2/(PAH/PSS)₄; (d) EGM-2/glass slide; (e) EBM-2/(PAH/PSS)₄; (f) EBM-2/glass slide. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as a loading control. **(D)** Ac-LDL (the first column shows the staining of isotype controls Ac-LDL uptake by unstimulated (e and f) and EGM-2 stimulated (c and d) WJ-MSCs on (PAH/PSS)₄. HUVECs were used as positive control (b) and WJ-MSCs as negative control (a). Nuclei counter-staining with DAPI appears in blue, whereas Ac-LDL uptake appears in red (×40 oil objective; scale bar=50 μm). **(E)** *In vitro* angiogenesis assay. Lumen-like structures were spontaneously formed by differentiated cells derived from WJ-MSCs (a and b) and by HUVECs (c and d) but not by WJ-MSCs (e and f). A full colour version of this figure is available at the *Immunology and Cell Biology* journal online.

inhibited the proliferation of the PBMCs in response to PHA and, second, that this inhibition only occurred in co-cultures in which cells were in direct contact (0.32 ± 0.12 versus $0.75 \pm 0.06 \mu\text{g ml}^{-1}$ for PHA-PBMC; $P < 0.01$). The immunosuppressive effect of WJ-MSCs was also confirmed, as proliferation of PBMCs stimulated by PHA was significantly inhibited by direct cellular contact with WJ-MSCs

(0.43 ± 0.06 versus $0.75 \pm 0.06 \mu\text{g ml}^{-1}$ for PHA-PBMCs alone; $P < 0.05$). Mitogen-stimulated PBMC proliferation was almost nearly restored in TW co-cultures ($0.76 \pm 0.09 \mu\text{g ml}^{-1}$ for both co-cultures versus $0.75 \pm 0.06 \mu\text{g ml}^{-1}$ for PHA-PBMCs alone), showing a major role for cellular contact in the immunosuppressive effect mediated by ELCs and WJ-MSCs.

To identify whether the suppressive effect was influenced by cytokines secreted by ELCs and WJ-MSCs, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 and tumor necrosis factor- α were quantified in cell culture supernatants. The concentration of cytokines detected in the medium of PHA-activated PBMCs cultured in the absence of WJ-MSCs or ELCs, was used as a positive control.

WJ-MSCs and ELCs secreted less IL-12p70 and IL-10 compared with the positive control and a significant reduction in the concentrations of tumor necrosis factor- α (6.78 ± 2 and 50 ± 28 pg ml $^{-1}$ for WJ-MSCs/PBMCs and ELCs/PBMCs, respectively, versus 652.9 ± 221 pg ml $^{-1}$ for PHA-PBMCs alone; $P < 0.05$). The concentration of IL-8 was also significantly decreased in WJ-MSCs/PBMCs co-culture ($20\,495 \pm 718$ versus $36\,470.7 \pm 7192$ pg ml $^{-1}$ for PHA-PBMCs alone; $P < 0.05$). We further noted an increase in concentration of IL-6 in both co-cultures, with higher levels observed in the ELCs/PBMCs co-culture ($12\,092.3 \pm 5.9$ versus $21\,865 \pm 847$

pg ml $^{-1}$ for PHA-PBMCs alone; $P < 0.005$) in comparison with WJ-MSCs/PBMCs co-culture ($19\,697 \pm 824.8$ versus $12\,092.3 \pm 5.9$ pg ml $^{-1}$ for ELCs/PBMCs co-culture; $P < 0.005$). Finally, the concentration of IL-1 β was higher in both co-cultures with greater amounts observed in WJ-MSCs/PBMCs co-culture (669.4 ± 179.8 and 214.1 ± 82 pg ml $^{-1}$ for WJ-MSCs/PBMCs and ELCs/PBMCs, respectively, versus 64 ± 28 pg ml $^{-1}$ for PHA-PBMCs alone; $P < 0.05$).

The immunomodulatory properties of WJ-MSCs are moderately altered after endothelial differentiation: impact on T and NK cells

To reduce interference from other cellular components such as B cells, monocytes and dendritic cells, we decided to investigate the effects of WJ-MSCs and ELCs on T and NK cells, by allowing or preventing direct cell-cell contact. Proliferation of activated T or NK cells was considered to be a 100% proliferative response (positive control).

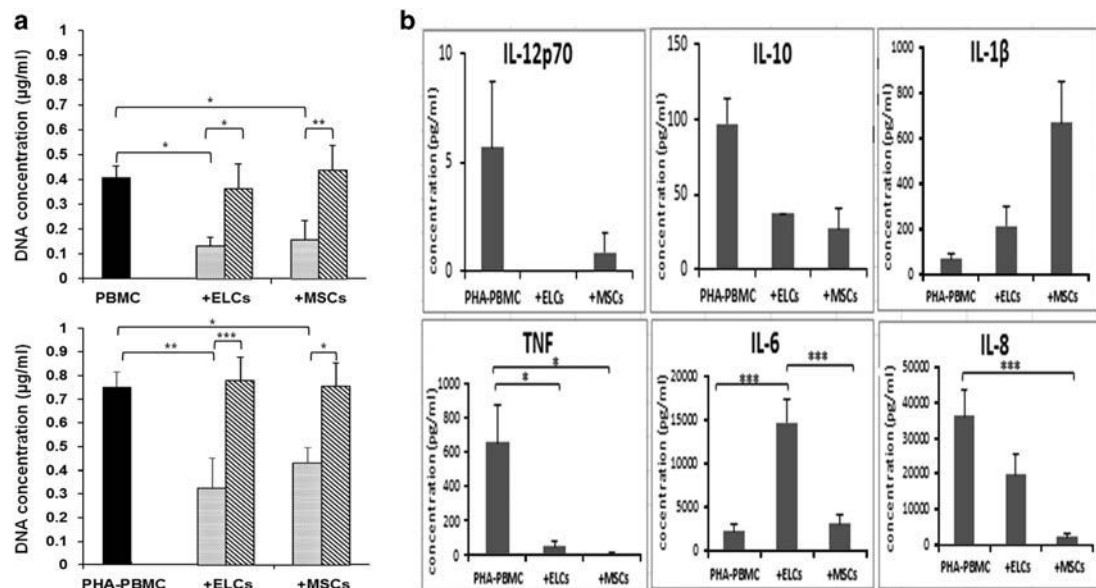


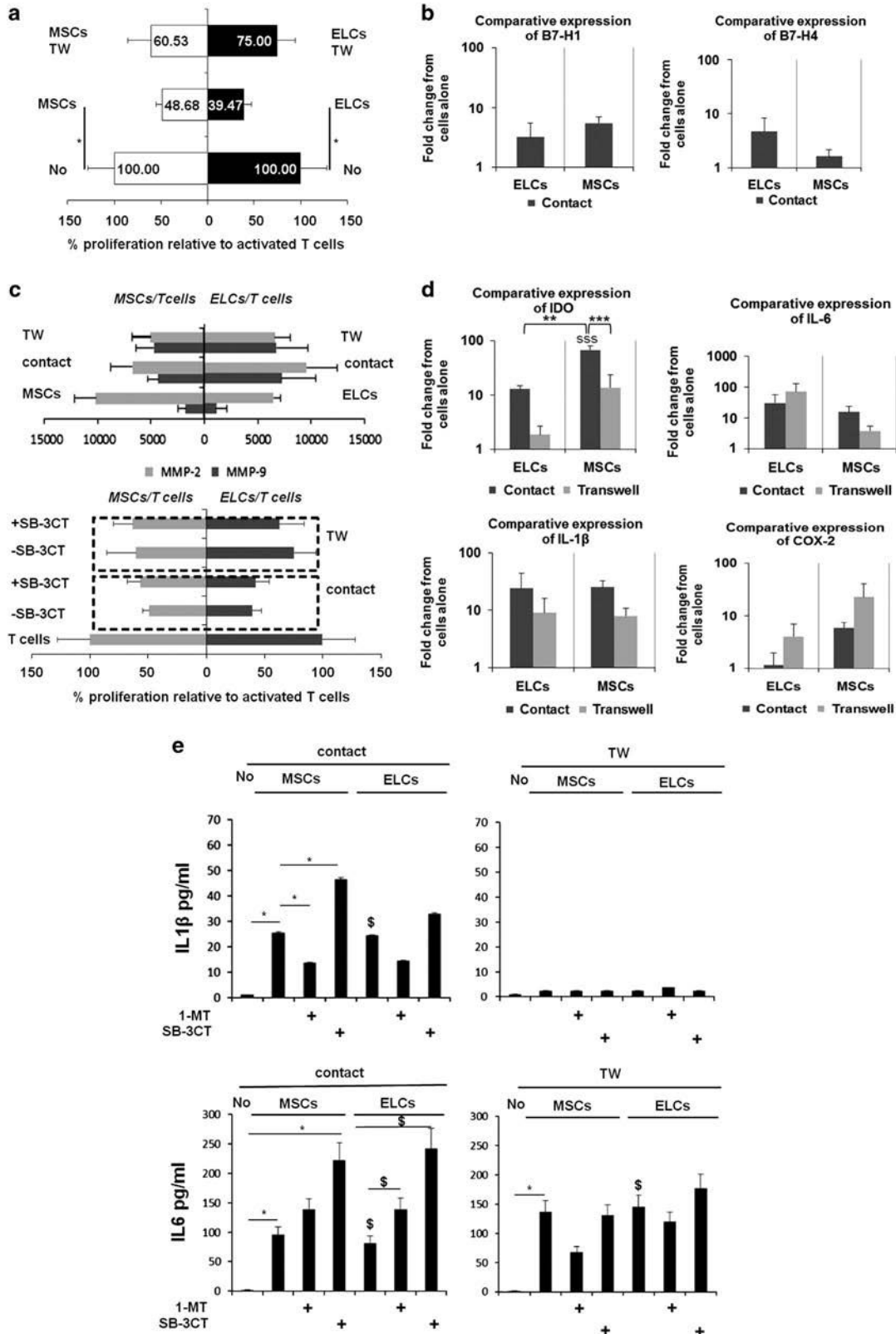
Figure 2 Immune characterization of ELCs: interactions with PBMCs. (a) Upper graph: WJ-MSCs and ELCs inhibit proliferation of PBMCs. Lower graph: non-activated and PHA-activated PBMCs were co-cultured in the presence of WJ-MSCs or ELCs at a 1:1 ratio in the presence or absence of cell-cell contact; the latter were performed using TW chambers. Data are shown as mean \pm s.e.m. ($n=3$). (b) PHA-activated PBMCs were co-cultured in the presence or absence of WJ-MSCs and ELCs at 1:1 ratio and IL12p70, TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10 and IL-1 β concentrations were determined in cell-free supernatants after 3 days of culture using the cytometric bead array assay. The concentration of cytokines detected in conditioned medium of activated PBMCs alone was used as a control. Data are shown as the mean \pm s.e.m. of the cytokine concentration in pg ml $^{-1}$ ($n=3$). *, ** and ***Statistically significant difference with $P < 0.05$, $P < 0.01$ and $P < 0.005$, respectively.

Figure 3 Comparison of the immunomodulatory effects of ELCs and WJ-MSCs on T cells. (a) WJ-MSCs and ELCs inhibit T-cell proliferation. Activated T cells were co-cultured in the presence of WJ-MSCs or ELCs at a 1:1 ratio either with or without cell-cell contact. Proliferation of activated T cells alone served as the positive control (100% of proliferation). (b) ELCs and WJ-MSCs express the contact molecules B7-H1 and B7-H4 mRNA after direct cell-cell contact with T cells. WJ-MSCs and ELCs cultured alone were used as controls. Expression of the contact molecules was determined by quantitative reverse-transcriptase PCR (qRT-PCR) and normalized using the housekeeping gene *RP29* and expressed as fold change from WJ-MSCs or ELCs. (c) Upper graph: levels of MMP-2 (63 kDa) and MMP-9 (82 kDa) in the conditioned medium of ELCs (right) or WJ-MSCs (left) after co-culture with T cells in the absence and presence of cell-cell contact were measured as band intensity by gelatin zymography. ELCs and WJ-MSCs were employed as controls. Lower graph: impact of the inhibition of MMPs by SB-3CT on T-cell proliferation during co-culture with ELCs (right) or WJ-MSCs (left). Proliferation of activated T cells alone was the positive control (100% of proliferation). (d) IDO, IL-6, IL-1 β and COX-2 mRNA expression in WJ-MSCs and ELCs after direct and TW co-culturing with activated T cells, as determined by qRT-PCR. WJ-MSCs and ELCs cultured alone were used as controls. The data were normalized using the housekeeping gene *RP29* and compared with controls. (e) IL-6 and IL-1 β concentrations determined in cell-free supernatants after 3 days of co-culturing between WJ-MSCs and T cells or ELCs and T cells using the cytometric bead array (CBA) assay. IL-6 was detected under both TW and contact conditions, whereas IL-1 β was detected mainly under contact conditions. *Statistically significant difference between the represented conditions with $P < 0.05$, $P < 0.01$ and $P < 0.005$, respectively (\$, \$\$ and \$\$\$, respectively, indicate the same statistically significant difference between a condition and the native non-stimulated cells). All data are mean \pm s.e.m. ($n=3$).

Immunosuppressive effects of ELCs on T cells

Our data show that WJ-MSCs significantly reduced T-cell proliferation ($487 \pm 65.9\%$), which was partially restored by preventing cell-cell contact ($60.5 \pm 25\%$). Only $395 \pm 8\%$ proliferation was observed when

T cells were in direct contact with ELCs. This inhibition was partially reversed in a TW with $75 \pm 19\%$ (Figure 3a). We next explored the expression of two contact molecules B7-H1 and B7-H4, which are possibly involved in the contact inhibition of T-cell proliferation. Our



data revealed weak expression of B7-H1 mRNA in both ELCs and WJ-MSCs (Figure 3b, left panel). B7-H4, on the other hand, was mainly expressed in ELCs (Figure 3b, right panel), with only weak expression detected in WJ-MSCs. However, our flow cytometry analysis could not confirm the expression of B7-H4 and B7-H1 at the surface of ELCs or WJ-MSCs (data not shown).

MSCs and mature ECs are able to secrete MMP-2 and -9, two factors which were recently shown to have immunomodulatory effects.^{25,26} We therefore aimed to determine whether WJ-MSCs and ELCs express MMP-2-soluble, active forms of MMP-2 and -9, using gelatin zymography. As shown in Figure 3c upper graph, both enzymes were readily detected in supernatants of WJ-MSCs and ELCs, with expression of MMP-2 approximately sixfold higher than that of MMP-9. No increase in MMP-2 concentration was detected after co-culture with WJ-MSCs, whether they were in direct contact or not, whereas a small increase was noticed after co-culture with ELCs under direct contact conditions. The largest increases in MMP-9 expression were observed following direct contact with ELCs. To assess the suppressive effect of MMPs on T-cell proliferation, we next examined the ability of an MMP inhibitor called SB-3CT,²⁷ to restore T-cell proliferation. Addition of SB-3CT restored the proliferation of T cells in direct contact co-cultures to a minor degree ($2.6 \pm 0.1\%$ and $3.9 \pm 0.1\%$ of restoration for, respectively, co-cultures with ELCs and WJ-MSCs; Figure 3c, lower graph), indicating that MMP-2 and -9 are only weakly involved in T-cell immunosuppression mediated by ELCs and WJ-MSCs. In contrast, no effect of the inhibitor was seen in a TW system.

We next explored other candidates as mediators of the suppression driven by ELCs. IDO, IL-1 β , IL-6, PGE2, hepatocyte growth factor and TGF- β have been reported to trigger T-cell suppression by WJ-MSCs;²⁸ thus, we examined the expression of these genes before and after endothelial differentiation on co-culture with T cells. WJ-MSCs or ELCs incubated in the absence of T cells were used as controls. In the presence of a direct interaction between T cells and WJ-MSCs, IDO expression was high; separation of the cells reduced the expression fivefold. After co-culture with ELCs, IDO expression was 12.8-fold higher than in the control and sevenfold higher in the contact condition than in TW. However, expression of IDO in ELCs was 5.2- and 7.4-fold lower, respectively, relative to WJ-MSCs in contact or in TW conditions. After co-culture with T cells, expression of IL-6 was 30- and 15-fold higher, respectively, than the controls for ELCs and WJ-MSCs, whereas its expression was reduced for WJ-MSCs and increased for ELCs in TW culture. IL-1 β expression after co-culture was 24- and 25-fold higher for ELCs and WJ-MSCs, respectively, relative to controls. Furthermore, we detected a higher expression of IL-1 β in ELCs than in WJ-MSCs, with a marked increase in the TW condition for ELCs. The expression level of cyclooxygenase (COX)-2, the enzyme producing PGE2, was essentially identical under all the conditions (Figure 3d). No changes in the expression of hepatocyte growth factor, COX-1 and TGF- β were detected under any of these conditions (data not shown).

As expression of IL-1 β and IL-6 was particularly upregulated in ELCs, we investigated whether the IDO inhibitor 1-methyl tryptophan (1MT) and the MMP inhibitor SB-3CT could influence their secretion (Figure 3e). The highest levels of IL-1 β were observed after culturing T cells in direct contact with ELCs or WJ-MSCs, concentrations after co-culture was 24.3 ± 0.2 and 25.5 ± 0.3 pg ml⁻¹ for ELCs and WJ-MSCs, respectively, which were higher than for T cells alone (1.01 ± 0.01 pg ml⁻¹). IL-1 β was significantly inhibited in the presence of 1MT and induced by SB-3CT for MSCs but not ELCs ($P \leq 0.05$). A

weak expression of IL1 β was detected in the TW conditions (Figure 3e: first and second graphs).

IL-6 was readily detected in the supernatant of T cells co-cultured with ELCs (81.6 ± 11.3 pg ml⁻¹) or WJ-MSCs (95.6 ± 13.2 pg ml⁻¹), with the highest levels seen under direct contact conditions. IL-6 secretion was significantly enhanced after incubating the cells co-cultured with WJ-MSCs either with 1MT or SB-3CT (138.4 ± 19.1 and 222.0 ± 30.7 pg ml⁻¹, respectively; $P \leq 0.05$). The same results were observed after co-culture with ELCs (139.1 ± 19.2 and 222.0 ± 30.7 pg ml⁻¹) in presence of 1MT and SB-3CT (Figure 3e: third and fourth graphs).

ELCs induce the generation of T-cell subsets displaying a regulatory phenotype. Previous work has shown that MMPs secreted by MSCs are involved in the inhibition of T-cell proliferation via shedding of the IL-2 receptor CD25.²⁵ We explored whether MMPs in the cell supernatant of ELCs and WJ-MSCs co-cultured with T cells could affect CD25 expression. Flow cytometry analysis showed a clear increase in the percentage of CD25⁺ T cells after co-culture with ELCs or WJ-MSCs under direct contact conditions ($62.1 \pm 4\%$ and $59.4 \pm 19\%$, respectively) compared with T cells alone ($37.8 \pm 8\%$; Figure 4b). The percentage of cells expressing CD25 was also slightly increased in the presence of a TW ($39.9 \pm 10\%$ and $40 \pm 14\%$, respectively, for ELCs and WJ-MSCs TW co-cultures). If MMPs were involved in the shedding of CD25, addition of MMPs inhibitor should increase the percentage of cells expressing CD25. However, addition of SB-3CT resulted in a slight decrease of the CD25⁺ population after co-culture with WJ-MSCs whether in direct contact or not, but not following co-culture with ELCs under equivalent conditions (Figure 4b).

Among candidates investigated as mediators of the immunosuppression, IDO expression was notably increased after co-culture with WJ-MSCs or ELCs. Thus, we next explored the effect of its inhibitor, 1MT, on CD25. The percentage of CD25⁺ T cells was lower after culture with WJ-MSCs separated by a TW in the presence of 1MT ($26.8 \pm 6.4\%$ versus $37.8 \pm 8\%$ for T cells alone; Figure 4b). No significant effect of the IDO inhibitor was seen on CD25 expression by T cells co-cultured with ELCs.

As IDO has been shown to promote Treg generation,²⁹ we investigated whether the CD25⁺ population expressed forkhead box P3 (FoxP3), which is a main marker of Tregs. Interestingly, after performing a gating on the CD4⁺ population, we detected an increase in the CD25⁺FoxP3⁺ population in co-cultures relative to activated T cells alone, which was higher in co-cultures with ELCs ($75 \pm 2.5\%$ versus $23 \pm 1.5\%$ for T cells alone) than with WJ-MSCs ($62 \pm 3.8\%$ versus $23 \pm 1.5\%$ for T cells alone; Figure 4c). Thus, we confirmed that WJ-MSCs generate Tregs, as demonstrated previously.^{30–32} Moreover, we showed that ELCs were able to induce a larger population of Tregs than WJ-MSCs. We next explored the effect of an IDO inhibitor (1MT) on Tregs generation. After co-culture of T cells with WJ-MSCs, we observed a moderate inhibition of $3 \pm 0.8\%$ under direct contact conditions, whereas the percentage reached $21 \pm 2.3\%$ when the cells were separated. No effect of the IDO inhibitor was detectable on Tregs generated by ELCs co-culturing (Figure 4c).

We also investigated the effect of MMPs on Tregs. Surprisingly, a decrease of the Tregs percentage was observed in every condition with the MMP inhibitor SB-3CT either in the presence of cell–cell contact or in a TW. Maximum inhibition of Tregs generation was seen when T cells were cultured in direct contact with ELCs where the percentage of Tregs dropped from $75 \pm 3\%$ to $64 \pm 4\%$ (Figure 4c).

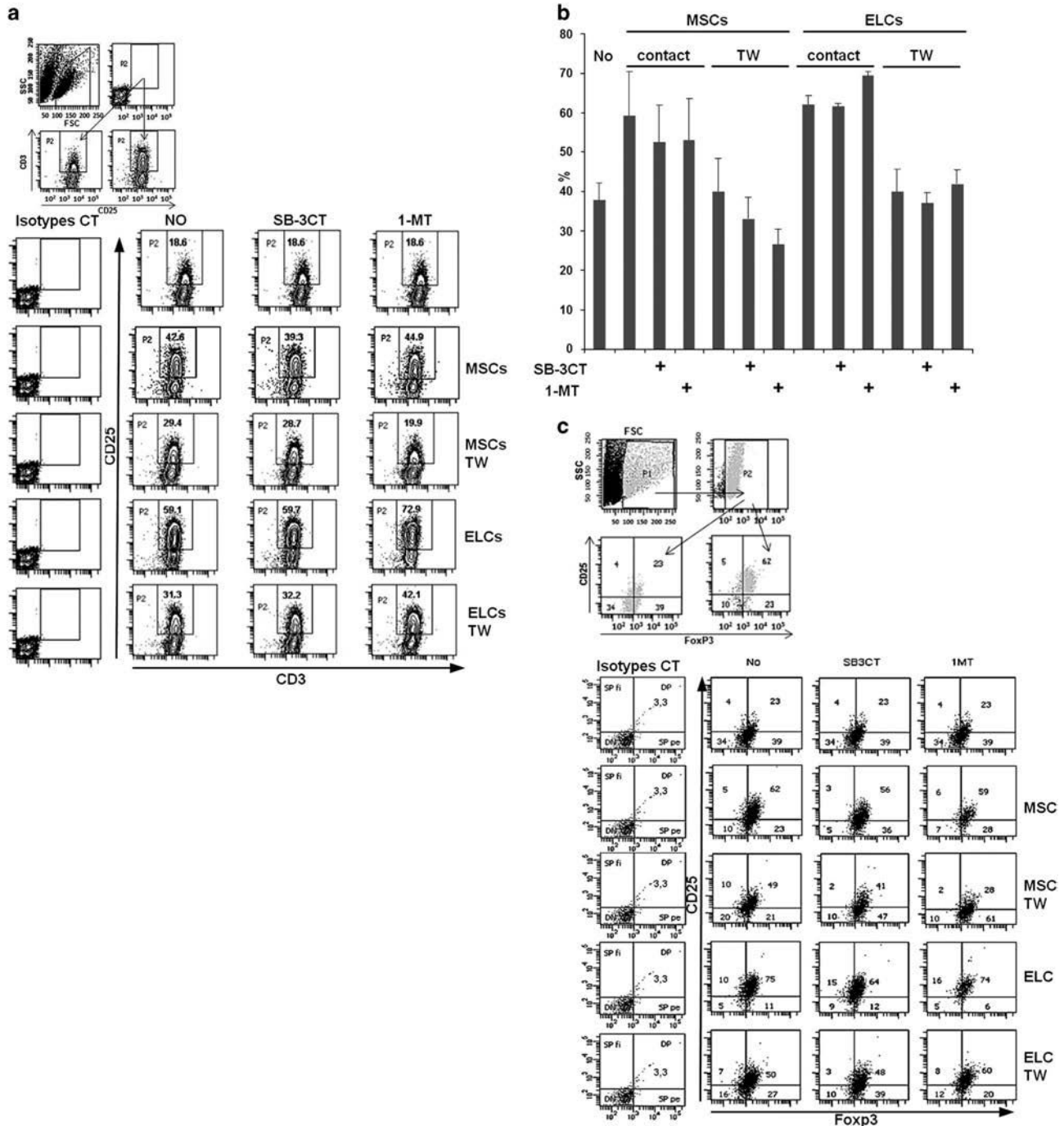


Figure 4 WJ-MSCs and ELCs induce the generation of T-cell population subsets displaying a regulatory phenotype. **(a)** On the top of the figure is included the gating strategy. Cells are gated by taking into account SSC (side scatter) and FSC (forward scatter) to select the lymphocyte population (P1 gate). The P2 gate was next set regarding the staining of control isotypes for anti-CD25 and anti-CD3 antibodies. The cells gated into the P2 gate were considered positive for CD25 and CD3. Representative dot plot of the percentage of CD3⁺CD25⁺ population after co-culturing of activated T cells in the absence or presence of WJ-MSCs and ELCs with or without SB-3CT (MMPs inhibitor) or 1MT (IDO inhibitor). These data show that CD25 is induced on T cells mainly following contact with WJ-MSCs or ELCs. The first column shows the staining of isotype control. **(b)** Mean percentage of CD3⁺CD25⁺ populations determined from three independent experiments (*n*=3). These data show a significant effect of 1MT on CD25 expression on T cells co-cultured with ELCs. **(c)** On the top of the figure is included the gating strategy. Cells are gated by taking into account SSC (side scatter) and FSC (forward scatter), to select the lymphocyte population (P1 gate). The P2 gate was next set on the CD4 positive population. On the cells gated into the P2 gate (CD4⁺ cells), the staining of anti-CD25 (Y axis and anti-FoxP3 antibody (X axis) was determined after placing the quadrants taking into account the isotype control staining. Representative dot plot showing the percentage of CD3⁺CD25⁺FoxP3⁺ cells determined on CD4⁺ T cells after co-culture with WJ-MSCs and ELCs under direct contact conditions. T cells cultured alone were employed as controls. The first column shows the staining of the isotype control and the four quadrants were defined as SP FI or PE (simple positive FITC or PE), DN (double negative) or DP (double positive). *, ** and ***Statistically significant difference between the represented conditions and the control with *P*<0.05, *P*<0.01 and *P*<0.005, respectively.

Immunosuppressive effects of ELCs observed on NK cells

We next evaluated the effects of WJ-MSCs and ELCs on the proliferation of activated NK cells. We used the proliferation of IL-15-stimulated NK cells as a control, scaling it to 100%. ELCs were able to reduce the proliferation of NK cells by $44.2 \pm 16.2\%$ in contact cultures versus $48.7 \pm 7.8\%$ in a TW. We also observed, in agreement with the literature,³³ that WJ-MSCs inhibit NK cell proliferation, either by direct contact or in a TW context, with $55.2 \pm 14\%$ and $59.1 \pm 16\%$ proliferation, respectively, relative to the control (Figure 5a).

We next examined the levels of B7H1 and B7H4 mRNA in ELCs and WJ-MSCs after contact with NK cells (Figure 5b, left and right panels). The levels of both mRNAs were enhanced in ELCs and WJ-MSCs after co-culture. However, flow cytometry analysis failed to reveal the encoded proteins on the surfaces of ELCs and WJ-MSCs (data not shown).

As MMPs have been shown to have immunomodulatory effects on NK cells,³⁴ the same procedure described above was applied to detect the activity of MMP-2 and MMP-9 in NK co-cultures. We observed higher levels of MMP-2 in direct co-cultures of ELCs with NK cells than in a TW and versus ELCs alone (Figure 5c, upper graph). In contrast, MMP-2 activity was not enhanced in a co-culture of WJ-MSCs with NK cells, either under contact or separated conditions. MMP-9 was slightly enhanced in the supernatant of both ELCs and WJ-MSCs cultured in contact with NK cells. However, the addition of SB-3CT to the co-cultures was not able to restore proliferation of NK cells (Figure 5c, lower graph). Taken together, these results suggest that inhibition of MMPs alone is not sufficient to restore NK-cell proliferation, and therefore that other mediators may be involved in this phenomenon. In follow-up experiments, we carried out co-culture with activated NK cells for 3 days and then evaluated the expression by ELCs and WJ-MSCs of the same genes that were tested above (Figure 5d). The expression profile changed from that observed after co-culture with T cells. In fact, IDO, IL-6 and IL-1 β expression was higher in ELCs than in WJ-MSCs grown in direct co-cultures (3.2-, 5.1- and 1.1-fold higher, respectively), but the expression of COX-2 was lower in ELCs than in WJ-MSCs. Hepatocyte growth factor, COX-1 and TGF- β showed no change of expression under all conditions tested (data not shown).

Quantification of IL-1 and IL-6 in NK cells supernatants further showed that IL-1 was largely secreted when NK cells were in contact with ELCs or WJ-MSCs (19.3 ± 0.8 and 38.3 ± 1.8 pg ml⁻¹, respectively, versus 1.1 ± 0.1 pg ml⁻¹ for NK cells alone; $P < 0.05$; Figure 5e, left panel), a phenomenon that could be enhanced by addition of 1MT ($P < 0.05$) and to a lesser extent SB-3CT (ns). No

significant secretion of IL-1 was seen in TW conditions (Figure 5e, right panel). IL-6 was detected in supernatant of NK cells after co-culture with ELCs (212 ± 35 pg ml⁻¹) or WJ-MSCs (158 ± 26 pg ml⁻¹) under both contact and TW conditions (240 ± 40 and 230 ± 40 pg ml⁻¹ for ELCs and WJ-MSCs, respectively). Inhibition of IL-6 secretion was observed in the presence of 1MT in both WJ-MSCs and ELCs (41% and 23% of inhibition, respectively) cultured in direct contact but reach significance only for WJ-MSCs, although the same tendency was observed with ELCs. A significant effect of SB-3CT on IL-6 secretion was observed only for WJ-MSCs. No significant effect of SB-3CT of 1MT supplementation was observed in the TW condition.

As IDO was strongly induced after co-culture with ELCs and WJ-MSCs, we next evaluated whether interferon- γ , a major cytokine secreted by NK cells, could be involved in the activation of IDO. The obtained data clearly show that direct contact between ELCs and WJ-MSCs with NK cells strongly induces interferon- γ secretion (0.76 ± 0.1 and 1.1 ± 0.3 ng ml⁻¹ for ELCs and WJ-MSCs, respectively, versus 0.56 ± 0.07 ng ml⁻¹ for NK cells alone).

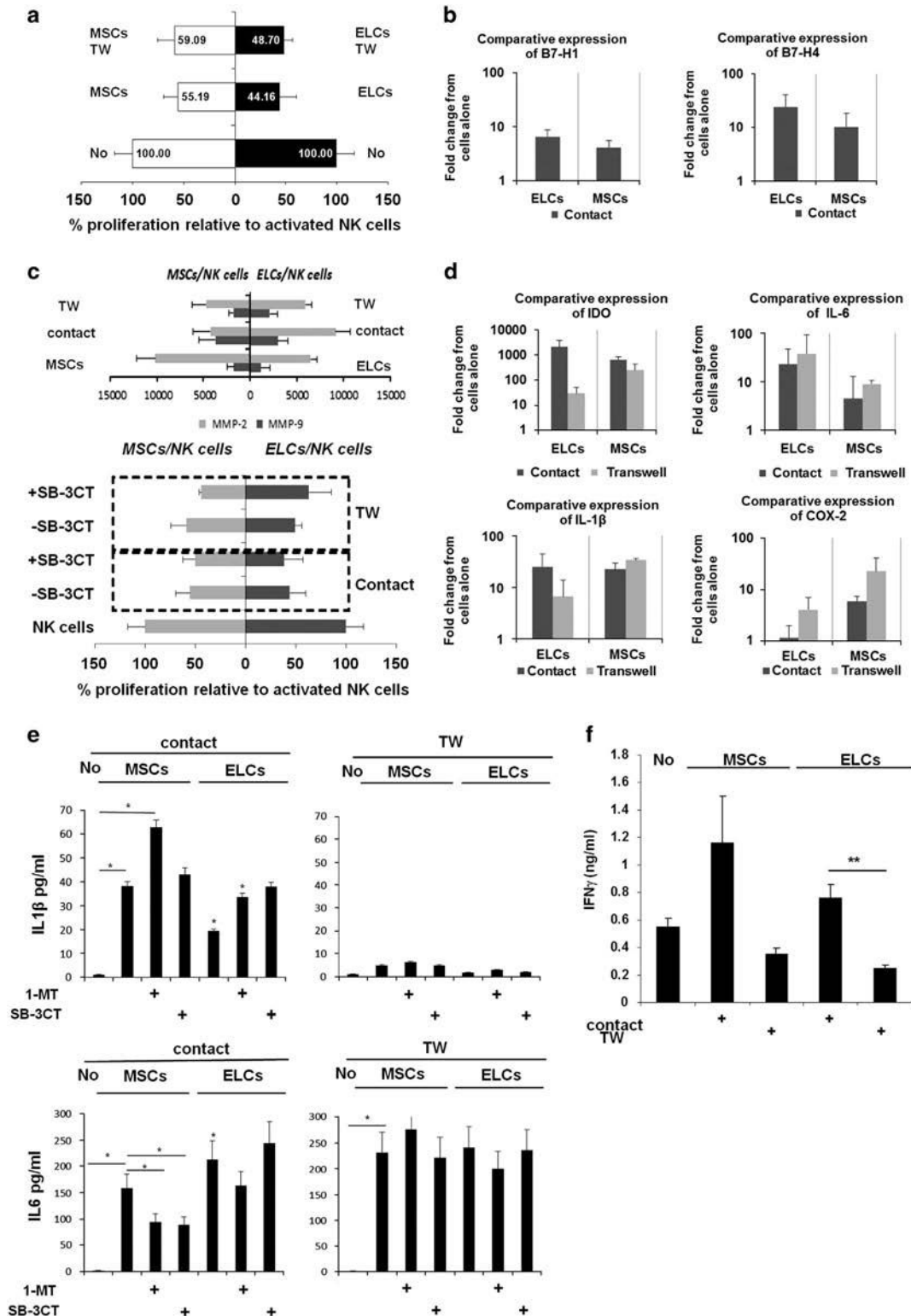
Impact of co-culture on expression of NK cell markers. To investigate whether WJ-MSCs and ELCs could have an effect on NK cells, expression of the NK cell receptors CD16, CD56 and natural-killer group 2, member D (NKG2D) was analyzed and compared with that detected after co-culturing with WJ-MSCs or ELCs in the absence or presence of cell-cell contact (Figures 6a and b). After 15 days of expansion in the presence of IL-15, NK-cell phenotyping revealed two populations: CD16⁺CD56⁺ and CD16⁻CD56⁺. The intensity of expression of CD56 was similar for the two subsets. After co-culture with WJ-MSCs, however, the partitioning between the two populations altered. As shown by the black arrow on the left, the cell population expressing CD16 and CD56^{bright} was no longer detected, while a new population appeared, which was CD16⁺ but which exhibited a lower level of CD56 (Figure 6a). Furthermore, we also observed an increase in the CD16⁺CD56^{bright} population, which reached 75.7%. In contrast, the percentage of the population corresponding to CD16⁺CD56^{bright} was increased in co-cultures of WJ-MSCs and NK cells under TW conditions, relative to isolated NK cells or those in direct contact with WJ-MSCs. The percentage of the CD16⁻CD56^{bright} population decreased from 75.1 to 38% when cells were not in direct contact. No change in the partitioning between the two NK populations was observed in direct or TW-separated ELCs/NK cell co-cultures.

As MMPs have been shown to modify CD16 expression on NK cells,^{35,36} we next examined whether the MMPs inhibitor SB-3CT could modify the NK-cell phenotype after co-culture. Interestingly, we observed that the CD16⁺CD56^{bright} population, which disappeared

Figure 5 Comparison of the immunomodulatory effects of ELCs and MSCs on NK cells. (a) ELCs and WJ-MSCs inhibit NK cell proliferation. Activated NK cells were co-cultured in the presence of WJ-MSCs or ELCs at a 1:1 ratio either with or without cell-cell contact during 3 days. Proliferation of activated NK cells alone was used as positive control (100% of proliferation). (b) Expression levels of B7-H1 and B7H4, factors that are potentially involved in direct cell-cell immunosuppression. B7-H1 and B7-H4 mRNA expression in WJ-MSCs and ELCs maintained in contact or not with activated NK cells was determined by quantitative reverse-transcriptase PCR (qRT-PCR), normalized using the housekeeping gene *RP29* and expressed as fold change from WJ-MSCs or ELCs alone. WJ-MSCs and ELCs cultured alone were used as controls. (c) Upper graph: band intensity of MMP-2 (63 kDa) and MMP-9 (82 kDa) as detected by gelatin zymography in the conditioned medium of ELCs (right) or WJ-MSCs (left), following co-culture with NK cells, either allowing for direct cell-cell contact or not. ELCs and WJ-MSCs were employed as controls. Lower graph: impact of the inhibition of MMPs by SB-3CT on NK-cell proliferation during co-culture with ELCs (right) or WJ-MSCs (left). Proliferation of activated NK cells alone was the positive control (100% of proliferation). (d) IDO, IL-6, IL-1 β and COX-2 mRNA expression in WJ-MSCs and ELCs after direct and TW co-culturing with activated NK cells, as determined by qRT-PCR. WJ-MSCs or ELCs alone were used as controls and the data were normalized using the housekeeping gene *RP29* and compared with controls. (e) IL-6 and IL-1 β concentrations determined in cell-free supernatants after 3 days of culture using the cytometric bead array (CBA) assay. The IL-6 concentration was significantly increased after indirect co-culture, whereas that of IL-1 β was increased mainly after cell-cell contact. (f) Interferon (IFN)- γ concentration (ng/ml) as determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in cell-free supernatants of NK cells after 3 days of co-culturing with WJ-MSCs or ELCs, under contact or TW conditions. The conditioned medium of activated NK cells alone was used as control. All data are shown as the mean \pm s.e.m. ($n = 3$).

after direct contact with WJ-MSCs in co-culture, was partially restored after addition of SB-3CT (Figure 6a, middle black arrow, and Figure 6b). However, in the case of WJ-MSCs without cell contact or ELCs with or without cell contact, the inhibitor did not significantly modify the partitioning between the cell populations (Figure 6b). As IDO was strongly expressed by ELCs and WJ-MSCs either in cell

contact or not, we also examined whether the IDO inhibitor 1MT could modify NK-cell phenotype after co-culture. Surprisingly, when 1MT was added to co-cultures with WJ-MSCs, we observed altered expression of CD56 and CD16 (Figure 6a, right black arrow), which was not seen when the cells were separated. As for co-culturing with ELCs, direct or indirect contact with NK cells did not significantly



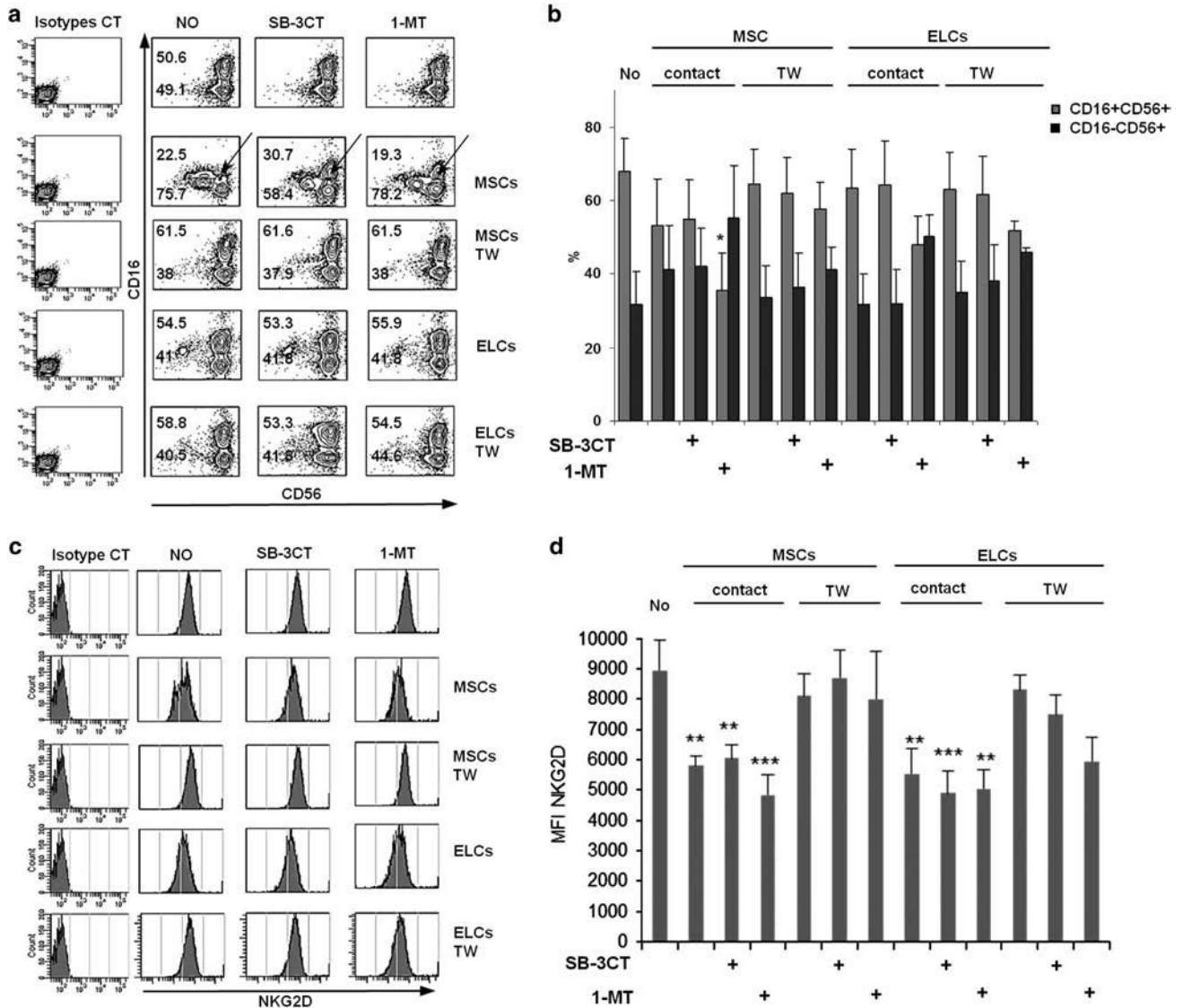


Figure 6 WJ-MSCs and ELCs modify NK-cell phenotype. (a and b) Determination by flow cytometry of the distribution and percentages of CD16⁺CD56⁺ and CD16⁻CD56⁺ populations. Activated NK cells were co-cultured in the absence or presence of WJ-MSCs and ELCs, and in the absence or presence of SB-3CT (MMP-2 and MMP-9 inhibitor) and 1MT (IDO inhibitor). Co-cultures were performed under both direct contact or TW conditions. The first column shows the staining of isotype controls for CD16 and CD56. (c and d) MFI of NKG2D was significantly inhibited after co-culture with WJ-MSCs or ELCs under direct contact conditions. The first column shows the staining of isotype control for NKG2D. Data shown in a and c are representative dot plots. Data in b and d are shown as the mean \pm s.e.m. ($n=3$).

modify the partitioning between the two populations, nor did addition of SB-3CT. However, supplementation with 1MT decreased the percentage of CD16⁺CD56⁺ NK cells from 63 to 48% and increased the percentage of CD16⁻CD56⁺ from 31.7 to 50.2% (Figure 6b).

We next examined the expression of NKG2D on NK cells after co-culture with ELCs and WJ-MSCs. As shown in Figures 6c and d, NKG2D levels were significantly decreased after co-culturing with WJ-MSCs and ELCs under direct contact conditions, with an MFI of 5804 ± 334 and 5533 ± 840 for NK cells in direct contact, respectively, with WJ-MSCs and ELCs, versus 8952 ± 978 for NK cells alone. Interestingly, expression of NKG2D was partially restored for NK cells cultured without direct contact with WJ-MSCs or ELCs. Inhibition of MMPs and IDO had no noticeable effect on NKG2D expression regardless of the culturing

conditions, as their inhibitors did not restore NKG2D expression (Figure 6d).

NK cells acquire CD73 on exposure to WJ-MSCs and ELCs. We observed that CD73 was the only WJ-MSCs marker whose expression was not modified during differentiation. As CD73 produces adenosine, it could have a role in immunosuppression mediated by WJ-MSCs and ELCs (Figure 1B). To test this hypothesis, we examined CD73 expression on NK cells after co-culturing with ELCs and compared it with CD73 expression on NK cells alone. After 3 days of co-culture with ELCs, CD73 expression increased from an MFI of 231 ± 54 to 1961 ± 917 , but CD73 uptake exhibited a high variability between cells from different individuals. We also confirmed that the co-culture with WJ-MSCs allowed CD73 transfer on NK cells, with an MFI reaching 989 ± 441 , as shown previously³³ (Figure 7). To exclude the possibility

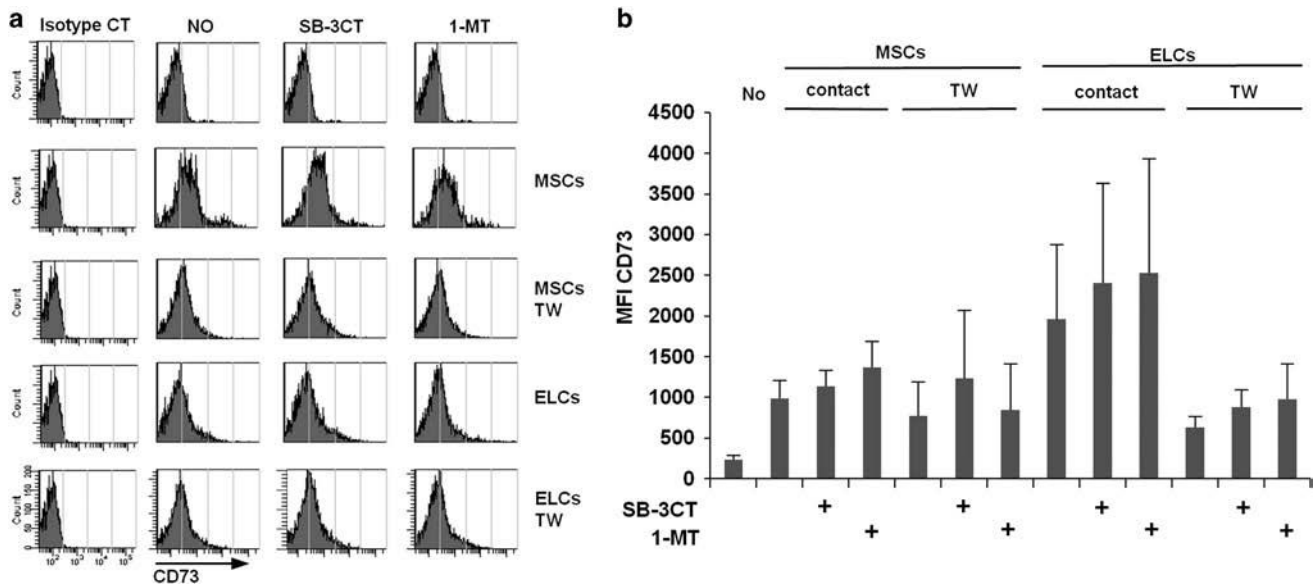


Figure 7 Flow cytometry analysis of CD73 expression on NK cells after co-culture with WJ-MSCs and ELCs under contact or TW conditions. (a) Representative histogram showing CD73 expression on NK cells after co-culturing with ELCs or WJ-MSCs under direct contact conditions. Activated NK cells were co-cultured in the absence or presence of WJ-MSCs and ELCs with or without SB-3CT (MMP-2 and MMP-9 inhibitor) and 1MT (IDO inhibitor). The first column shows the staining of isotype control for CD73. (b) CD73 MFI from three independent experiments determined under the same culture condition as described in a ($n=3$).

that the interaction between the cells can induce the expression of CD73 in NK cells, a real-time PCR for CD73 was performed on purified NK cells and compared with the CD73 expression detected in endothelial cells from the umbilical artery, used as a positive control. The result showed no expression of CD73 mRNA in NK cells (data not shown), confirming that the expression of CD73 on NK cells was due to a transfer.

DISCUSSION

Regeneration of blood vessels for the treatment of vascular-related diseases is one of the most important research areas in tissue engineering based on ECs.^{37–39} However, the use of ECs is hampered by a number of factors.^{40,41} MSCs have been considered as alternatives, as they can be used in an allogeneic setting without the need for immunosuppressive therapy.⁴⁰

WJ, the main component of the extracellular matrix of umbilical cord, is known to contain a population of fibroblast-like cells that are described as MSCs.⁴² The major objective of the present study was to determine whether the immune regulatory properties of MSCs are modified by differentiating them toward an endothelial phenotype. For this, we aimed to obtain ELCs from WJ-MSCs by combining a functionalized cell culture surface and growth factors. Endothelial differentiation was assessed by the expression of CD31, VE-cadherin and VE growth factor receptor 2 on ELCs. These three proteins are endothelial-specific markers known to have an important role in maturation of the endothelium during the angiogenesis process.⁴³ Our CD31 expression result is at odds with the studies of Oswald *et al.*⁴⁴ and Janeczek *et al.*,²¹ who reported no change in CD31 expression in differentiated BM-MSCs. Thus, the expression of these markers by WJ-MSCs seems to promote differentiation toward the endothelium.

We next demonstrated that our differentiated cells were functional, as we observed both efficient uptake of Ac-LDL and tubular structure formation in an extracellular matrix gel. Although several studies have shown that uptake of Ac-LDL by ECs is modulated by shear stress,^{45,46}

Ac-LDL was successfully incorporated by ELCs under our static culture conditions.

Previous studies have shown that the hypoimmunogenicity of MSCs derives from the absence of HLA-DR and CD86 expression. In this study, the expression of HLA-DR and CD86 was barely detectable, suggesting that even after differentiation ELCs remained immunoprivileged. This result contrasts with previous reports, in which *in vitro* differentiation of allogeneic BM-MSCs into myogenic, smooth muscle, endothelial¹⁷ and neuronal¹⁶ lineages significantly increased the expression of major histocompatibility complex-II.

We also observed that our produced ELCs were not immunogenic, as they did not stimulate allogeneic PBMCs in co-culture. Furthermore, they were immunosuppressive, as they modulated PHA-stimulated PBMCs alloproliferation. In fact, the suppressive effect was enhanced by ELCs in comparison with WJ-MSCs and largely exerted under conditions of contact. Similar results were obtained after differentiation of MSCs into adipose, bone and cartilage lineages.^{14,15,47} These results led us to investigate the effects of differentiated cells on: (1) a population of cells enriched in CD3⁺ T cells, the major effector cells of adaptive immunity,⁴⁸ and (2) NK cells, as they represent the major effector of the innate immune response exhibiting a critical role in early host defense against infections and cancer.⁴⁹

We noticed that ELCs, and to a lesser extent WJ-MSCs, suppressed the proliferation of activated CD3⁺ T cells, mainly under cell–cell contact conditions. Inhibition of CD3⁺ T cells by human BM-MSCs,^{50–53} umbilical cord blood MSCs,⁵⁰ placenta MSCs^{50,54} and umbilical cord MSCs^{55,56} had already been described in the literature; however, we are the first to show that endothelial differentiation of WJ-MSCs do not alter this capacity.

Our subsequent goal was to determine the mechanisms by which WJ-MSCs and ELCs exert their immunosuppression. Candidate enzymes investigated in this context were MMPs. In addition to the important role of MMPs in the modification of the extracellular matrix, cell mobilization and cell–extracellular matrix interactions,

MMPs act on additional substrates such as cytokines and inflammatory mediators, and thus have an effect on immune response regulation and cell proliferation.^{57,58} Ding *et al.*²⁵ have found that MMP-2 and MMP-9 have a significant role in the immune suppressive activity of murine BM-MSCs, and that blocking these two MMPs completely restores T-cell proliferation. Furthermore, MMPs have been shown to be involved in the shedding of CD25. Here we have shown that downregulation of CD25 expression inhibits T-cell proliferation mediated by IL-2. However, although MMP-2 and MMP-9 were detected in supernatants of ELCs and WJ-MSCs co-cultured with T cells, we observed that (1) addition of SB-3CT did not have a major effect on restoring T-cell proliferation and (2) CD25 expression on T cells increased after co-culture with ELCs or WJ-MSCs.

We hypothesized that this increase was due to proliferation of a Tregs population, as was previously demonstrated by Selmani *et al.*⁵⁹ and others.^{30,50,60,61} This idea was subsequently confirmed by demonstrating that the population of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ detected in direct co-cultures with ELCs or WJ-MSCs increased significantly relative to appropriate controls. Similarly, addition of SB-3CT decreased Tregs production, consistent with the idea that MMPs have a role in their generation.⁶² Among the other mediators identified as actors in MSCs immunomodulation, we observed no TGF- β , hepatocyte growth factor and COX-1 expression by ELCs and WJ-MSCs in all culture conditions, a result that contrast with previous studies.^{63,64} IL-6 and IL-1 β were detected in T cells co-cultured with WJ-MSCs and ELCs. IL-1 β has been shown to be involved in the proliferation of Tregs;^{65,66} thus, this mediator conjugated with IDO^{67–70} could be involved in their expansion. However, our results also revealed high expression levels of COX-2. This enzyme is responsible for producing PGE2, a prostaglandin that promotes Tregs differentiation.⁷¹ Thus, we cannot exclude the involvement of PGE2 in the generation of Tregs observed in our study.

The immunosuppressive effects of ELCs were also confirmed on NK cells, as their proliferation was partially inhibited. Among the soluble mediators that could be involved in inhibition of NK proliferation, MMP-2 and MMP-9, IDO, IL-6 and IL-1 β cannot be excluded, in particular after direct contact between NK cells and ELCs. Recently published data have revealed an autocrine loop between IDO⁷² and IL-6.⁷³ More specifically, IDO-mediated aryl hydrocarbon receptor activation induced IL-6 expression, whereas inhibition or knockdown of the aryl hydrocarbon receptor reduced IL-6 expression. These data explain our observation that the use of an IDO inhibitor resulted in a decrease in IL-6 concentration in NK-cell supernatants.

As to the NK-cell phenotype after co-culture culturing with ELCs, no change in the partitioning between cell populations was observed. In contrast, the CD16⁺CD56⁺ population was no longer observed after co-culturing with WJ-MSCs but partially restored after adding IDO and MMPs inhibitors. This latter result is in agreement with studies showing that MMPs are involved in the shedding of CD16, which occurs after NK-cell activation and places the cells in a refractory phase.³⁵

We next examined the impact on NKG2D expression of co-culturing NK cells with ELCs. We focused on this receptor, because several studies have reported that the inhibitory effects on MSCs are closely related to the downregulation of activating receptors, especially NKG2D.⁷² The decrease in NKG2D that we observed after contact with ELCs accords with a recent publication by Chauveau *et al.*,⁷⁴ in which it was demonstrated that ECs activation and proliferation modulate NKG2D activity. This may have an impact on NK-cell-mediated cytotoxicity. In the case of WJ-MSCs, we observed the same results as Spaggiari *et al.*,⁷² which were an inhibition of NK-cell

proliferation and modification of phenotype. As Spaggiari *et al.*⁷² highlighted the role of IDO and PGE2 in this phenomenon, we tested whether 1MT could restore NKG2D expression. Surprisingly, addition of 1MT did not have the expected effect, suggesting that restoration of NKG2D expression may require the inhibition of more than one mediator.

Finally, we cannot exclude a role of adenosine in the immunosuppressive effects of ELCs that we observed on NK cells, regarding ELCs high expression level of CD73. In addition to the roles of adenosine in the endothelial microenvironment, it has been shown that adenosine is a potent immunosuppressor involved in inhibiting the expression of IL-2, CD25, interferon - γ and tumor necrosis factor- α , and that it decreases the cytolytic activity of cytotoxic T cells.^{75,76} Very recently, NK cells were shown to acquire the expression of CD73 after a co-culture with MSCs, and that CD73⁺ NK cells had the ability to convert adenosine monophosphate into adenosine.³³ Our results confirm not only that NK cells are able to acquire CD73 on co-culture with WJ-MSCs, but that the proportion of CD73⁺ NK cells is higher after co-culture with ELCs. Further studies should confirm whether the upregulation of CD73 in NK cells is accompanied by increased enzyme activity.

In conclusion, our results show that WJ-MSCs and ELCs share many immunomodulatory properties. Nevertheless, the extent of expression of soluble mediators differed according to the immune cell type with which they were co-cultured and whether direct cell–cell contact was allowed.

Thus, this work shows overall that the immunological features of WJ-MSCs after endothelial differentiation may allow their application in regenerative medicine, as they appear likely to be immunotolerated by immune cells.

METHODS

Reagents were obtained from Sigma-Aldrich (Munich, Germany) and media components by from Lonza (Levallois-Perret, France), unless specified otherwise.

WJ-MSCs isolation and culture

Human umbilical cords were obtained after birth delivery and informed consent using the guidelines approved by the University Hospital Center of Nancy. WJ-MSCs were isolated as described by Peta *et al.*⁷⁷ and cultured in α -minimum eagle medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 100 IU ml⁻¹ penicillin, 100 μ g ml⁻¹ streptomycin, 2 mM L-glutamine and 205 mg ml⁻¹ Fungizone (Life Technologies, Grand Island, NY, USA).

Induction of endothelial differentiation

After the third passage, WJ-MSCs were collected and then seeded on (PAH/PSS)₄ polyelectrolyte multilayer film-coated glass slides, as described elsewhere.⁷⁸ Uncoated glass was used as control. After reaching 60% of cell confluence, the medium was replaced by EBM-2 or differentiation medium, which consisted of EGM-2 (EBM-2 supplemented with growth factors) and incubated for 2 weeks. EBM-2 was supplemented with 0.5% heat-inactivated FBS, 100 IU ml⁻¹ penicillin, 100 μ g ml⁻¹ streptomycin, 2 mM L-glutamine and 205 mg ml⁻¹ Fungizone. As a control, cells were cultured either on non-coated or coated glass with EBM-2. Cell morphology was monitored daily by optical microscopy (Nikon, UFX-DX, Tochigi, Japan). Following 15 days of culture under the differentiation conditions with EGM-2, cells were identified to be ELCs. WJ-MSCs and HUVEC cells were respectively used as negative and positive controls.^{39,79} HUVEC cells were isolated according to Jaffe *et al.*⁸⁰ and cultured in EBM-2 supplemented with 10% heat-inactivated FBS.

Characterization of ELCs

Endothelial differentiation was assessed by western blotting. Cells were collected in RIPA (radioimmunoprecipitation assay buffer) lysis buffer. Twenty micrograms of protein lysates were subjected to SDS-PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis) resolution and transferred to polyvinylidene difluoride membranes. Membranes were blocked with 5% bovine serum albumin in Tris buffered saline-Tween 20 solution and then probed with the following primary antibodies to endothelial phenotypic markers: CD31 (Dako Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA, M0823), VE-cadherin (Abcam, Cambridge, UK, ab33168), VE growth factor receptor 2 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA, 55B11) and to glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (Santa Cruz, Dallas, TX, USA, sc-51906) as a loading control. The membranes were then incubated with appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody at room temperature and bands were detected by chemiluminescence.

ECs have the ability to incorporate Ac-LDL. The functionality of the ELCs was thus assessed using an Ac-LDL uptake assay performed as described by Doan *et al.*⁸¹ Analysis of capillary formation was performed with an *in vitro* angiogenesis assay. For this, extracellular matrix gel solution (ScienCell, Carlsbad, CA, USA) maintained at 4 °C was added onto μ -Slide Angiogenesis (Ibidi, Munich, Germany) and incubated for 30 min at 37 °C to allow solidification. Differentiated cells and controls (HUVECs and WJ-MSCs) were suspended in culture medium at a density of 2×10^5 cells per ml and 50 μ l of each solution was plated on solidified extracellular matrix gel. After 4 h of incubation (37 °C), capillary formation was analysed by light microscopy.

Isolation and culture of PBMCs, T cells and NK cells

Peripheral blood samples were obtained from healthy volunteers with informed consent for blood collection and biological studies, using the guidelines approved by the French blood collection center Lorraine Champagne. PBMCs, T cells and NK cells were collected and cultured as previously described,⁸² except for CD3⁺ T cells that were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% AB serum, 2 mM glutamine, 1 μ g ml⁻¹ streptomycin, 1 IU ml⁻¹ penicillin and 5 μ g ml⁻¹ PHA (Oxoid, Dardilly, France). After 3 days, 100 μ g ml⁻¹ of IL-2 (Biotechnie, Lille, France) was added to the culture medium until day 14, when the cells were collected.

In vitro assays for testing the immunomodulatory effects of WJ-MSCs and ELCs on the proliferation of PBMCs

One-way mixed lymphocyte reaction. To determine whether WJ-MSCs and ELCs function as alloantigen presenting cells, one-way mixed lymphocyte reactions were performed. For this, freshly isolated PBMCs were added to WJ-MSCs or ELCs at a 1:1 ratio and allowed to proliferate in co-culture for 3 days. PBMCs seeded alone were used as control. Co-cultures were performed either by putting the two cell populations in direct contact or by separating them using a TW membrane (pore size: 0.4 μ m; Millicell Inserts, Dutscher, Brumath, France). After 3 days of culture, non-adherent immune cells, adherent ELCs and WJ-MSCs, and supernatants were respectively collected for DNA quantification, RNA extraction and cytokine dosage.

Mitogen-stimulated proliferation of PBMCs. To determine the effects of WJ-MSCs and ELCs on the PHA-stimulated proliferative response of allogeneic PBMCs, freshly isolated responder PBMCs stimulated with 10 μ g ml⁻¹ PHA were added to cultures of WJ-MSCs and ELCs, as described above. Cultures of unstimulated and PHA-stimulated PBMCs seeded alone were used as controls. Co-cultures were performed either by putting the two cell populations in direct contact or by separating them using a TW.

Co-culturing of WJ-MSCs and ELCs with T or NK cells

Immune cells (expanded T or NK cells) were cultured for 3 days with WJ-MSCs and ELCs at a ratio of 1:1 in RPMI-1640 10% FBS containing 100 μ g ml⁻¹ IL-2 for co-culturing with T cells and in α -minimum eagle medium 10% FBS IL-15 containing 50 ng ml⁻¹ for co-culturing with NK cells, either allowing for direct contact or keeping the cells separated by a TW. For inhibition experiments, the cells were cultured in the presence of 60 μ M

SB-3CT, a specific inhibitor of MMP-2 and MMP-9, and 1 mM of the IDO inhibitor 1MT.

Measure of immune cell proliferation

DNA from immune cells (PBMCs, T cells or NK cells) in co-culture was measured as a marker of cell quantity using Hoechst 33258 (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) as shown by Poleni *et al.*⁸³.

Flow cytometry

Cells were incubated in 0.5% human serum albumin in phosphate buffered saline staining buffer and stained with fluorescein isothiocyanate (FITC)-, phycoerythrin (PE)- or allophycocyanin-conjugated antibodies or corresponding isotype controls (CD25 FITC, CD45 FITC, CD90 FITC, B7H1 FITC, FoxP3 PE CD34 PE, CD73 PE, CD105 PE, B7H4 PE, CD3 allophycocyanin from BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ, USA; and CD16 FITC, HLA-DR PE, NKG2D PE, CD86 PE, CD56 allophycocyanin from Miltenyi Biotec, Tubingen, Germany) for 30 min at room temperature followed by two washes in staining buffer. For intracellular staining of FoxP3, cells were fixed with 1% paraformaldehyde and permeabilized with phosphate buffered saline 0.5% human serum albumin, 0.1% Triton X-100. Labeled cells were acquired by FACS Canto I (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) and 100 000 events were analyzed using FACS Diva Software (BD Biosciences). For double or triple staining performed by flow cytometry, isotype controls were used to place region and quadrants. Immune cells were immunophenotyped after co-culture with or without WJ-MSCs or ELCs under direct contact or TW conditions, in the presence or absence of IDO and MMPs inhibitors. NK cells were identified as CD16⁺CD56⁺ cells and the expression levels of NKG2D and CD73 were determined by gating this population. For T cells, the CD25 marker was quantified after gating the CD3⁺ population. Tregs were identified as CD25⁺FoxP3⁺ cells, after gating on the CD4⁺ population. The WJ-MSCs phenotype was evaluated before and during differentiation into ELCs by verifying the expression of CD73, CD90 and CD105, and the absence of CD34 and CD45. Expression of two immunological markers, HLA-DR and CD86, was also monitored.

Real-time quantitative PCR

After removing the suspension of lymphocytes from co-culture, total RNA from adherent cells was isolated using QIAzol lysis reagent and RNeasy Micro Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. One hundred nanograms of total RNA was reverse transcribed using iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Real-time PCR was performed using iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad) and the StepOnePlus system (Life Technologies, Grand Island, NY, USA). The indicated genes (Supplementary Table 1 and Supplementary Material) were analyzed by choosing ribosomal protein 29 (RP29) gene as the housekeeping gene for normalization.

Cytokine determination in cell culture supernatants by cytokine bead array

IL-12p70, tumor necrosis factor, IL-10, IL-6, IL-1 β and IL-8 concentrations were quantitatively measured in culture supernatants using the BD Cytometric Bead Array Inflammation Kit (BD Biosciences) according to the manufacturer's instructions.

Detection of MMP-2 and MMP-9

Gelatin zymography was performed on culture supernatants to assess secreted MMP-2 and -9 activities, as described previously.⁸⁴ Gels were scanned with a calibrated GS-800 imaging densitometer (Bio-Rad) and analyzed using ImageJ (National Institutes of Health, USA).

INF- γ detection by enzyme-linked immunosorbent assay

Cultured cell supernatants were collected after 3 days of co-culture and tested in triplicate for the production of INF- γ (Peprotech, 900-M27; Neuilly sur Seine, France) by enzyme-linked immunosorbent assay according to the manufacturer's instructions. The enzyme-linked immunosorbent assay plates were read

at OD 405 nm with a standard microplate reader (Multiskan EX, Thermo LabSystems, Helsinki, Finland). The results were expressed in ng ml^{-1} .

Statistical analysis

Data are presented as mean \pm s.e.m. for each condition. Pairwise comparisons were performed using one-factor analysis of variance with Fisher's correction (Statview IVs, Abacus Concepts Inc., Berkeley, CA, USA). Differences were considered significant for *P* (rejection level of the null hypothesis of equal means) values < 0.05 .

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Professor Kira Weissmann for the careful reading of the manuscript, Dr Cédric Boura for providing suitable controls for B7H1 and H4 staining, and Anne-Sophie Willemin for her help in extracellular matrix gel experiment analysis. We thank the Research Federation 3209 for providing access to an accurate Flow cytometer, the CNRS and The Region Lorraine for funding our research.

- Kurobe H, Maxfield MW, Breuer CK, Shinoka T. Concise review: tissue-engineered vascular grafts for cardiac surgery: past, present, and future. *Stem Cells Transl Med* 2012; **1**: 566–571.
- Caplan A. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *J Pathol* 2009; **217**: 318–324.
- El Omar R, Beroud J, Stoltz JF, Menu P, Velot E, Decot V. Umbilical cord mesenchymal stem cells: the new gold standard for mesenchymal stem cell based therapies? *Tissue Eng Part B Rev* 2014; **20**: 523–544.
- De Miguel MP, Fuentes-Julian S, Blázquez-Martínez A, Pascual CY, Aller MA, Arias J *et al*. Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells: advances and applications. *Curr Mol Med* 2012; **12**: 574–591.
- Hass R, Kasper C, Böhm S, Jacobs R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): a comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun Signal* 2011; **9**: 12.
- Mandapathil M, Hildorfer B, Szczepanski MJ, Czysowska M, Szajnik M, Ren J *et al*. Generation and accumulation of immunosuppressive adenosine by human CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ regulatory T cells. *J Biol Chem* 2010; **285**: 7176–7186.
- Cuerquis J, Romieu-Mourez R, François M, Routy J-P, Young YK, Zhao J *et al*. Human mesenchymal stromal cells transiently increase cytokine production by activated T cells before suppressing T-cell proliferation: effect of interferon- γ and tumor necrosis factor- α stimulation. *Cytotherapy* 2014; **16**: 191–202.
- La Rocca G, Corrao S, Lo Iacono M, Corsello T, Farina F, Anzalone R. Novel immunomodulatory markers expressed by human WJ-MSC: an updated review in regenerative and reparative medicine. *Open Tissue Eng Regen Med J* 2012; **5**: 50–58.
- Najar M, Raicevic G, Jebbawi F, De Bruyn C, Meuleman N, Bron D *et al*. Characterization and functionality of the CD200-CD200R system during mesenchymal stromal cell interactions with T-lymphocytes. *Immunol Lett* 2012; **146**: 50–56.
- Pietilä M, Lehtonen S, Tuovinen E, Lähteenmäki K, Laitinen S, Leskelä H-V *et al*. CD200 positive human mesenchymal stem cells suppress TNF- α secretion from CD200 receptor positive macrophage-like cells. *PLoS ONE* 2012; **7**: e31671.
- Whiteside TL, Mandapathil M, Schuler P. The role of the adenosinergic pathway in immunosuppression mediated by human regulatory T cells (Treg). *Curr Med Chem* 2011; **18**: 5217–5223.
- Yen BL, Chang CJ, Liu K-J, Chen YC, Hu H-I, Bai C-H *et al*. Brief report—human embryonic stem cell-derived mesenchymal progenitors possess strong immunosuppressive effects toward natural killer cells as well as T lymphocytes. *Stem Cells Dayt Ohio* 2009; **27**: 451–456.
- Song H, Park H, Kim J, Park G, Kim Y-S, Kim SM *et al*. IDO metabolite produced by EBV-transformed B cells inhibits surface expression of NKG2D in NK cells via the c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway. *Immunol Lett* 2011; **136**: 187–193.
- Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringdén O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol* 2003; **31**: 890–896.
- Liu H, Kemeny DM, Heng BC, Ouyang HW, Melendez AJ, Cao T. The immunogenicity and immunomodulatory function of osteogenic cells differentiated from mesenchymal stem cells. *J Immunol Baltim Md 1950* 2006; **176**: 2864–2871.
- Liu C-T, Yang Y-J, Yin F, Wang X, Yu X-H, Wang Q-H *et al*. The immunobiological development of human bone marrow mesenchymal stem cells in the course of neuronal differentiation. *Cell Immunol* 2006; **244**: 19–32.
- Huang X-P, Sun Z, Miyagi Y, McDonald Kinkaid H, Zhang L, Weisel RD *et al*. Differentiation of allogeneic mesenchymal stem cells induces immunogenicity and limits their long-term benefits for myocardial repair. *Circulation* 2010; **122**: 2419–2429.
- Li P, Li S-H, Wu J, Zang W-F, Dhingra S, Sun L *et al*. Interleukin-6 downregulation with mesenchymal stem cell differentiation results in loss of immunoprivilege. *J Cell Mol Med* 2013; **17**: 1136–1145.
- Liu S, Yuan M, Hou K, Zhang L, Zheng X, Zhao B *et al*. Immune characterization of mesenchymal stem cells in human umbilical cord Wharton's jelly and derived cartilage cells. *Cell Immunol* 2012; **278**: 35–44.
- Zhang P, Baxter J, Vinod K, Tulenko TN, Di Muzio PJ. Endothelial differentiation of amniotic fluid-derived stem cells: synergism of biochemical and shear force stimuli. *Stem Cells Dev* 2009; **18**: 1299–1308.
- Janeczek Portalska K, Leferink A, Groen N, Fernandes H, Moroni L, van Blitterswijk C *et al*. Endothelial differentiation of mesenchymal stromal cells. *PLoS ONE* 2012; **7**: e46842.
- Rammal H, Beroud J, Gentils M, Labrude P, Menu P, Kerdjoudj H *et al*. Reversing charges or how to improve Wharton's jelly mesenchymal stem cells culture on polyelectrolyte multilayer films. *Biomed Mater Eng* 2013; **23**: 299–309.
- Boura C, Menu P, Payan E, Picart C, Voegel JC, Muller S *et al*. Endothelial cells grown on thin polyelectrolyte multilayered films: an evaluation of a new versatile surface modification. *Biomaterials* 2003; **24**: 3521–3530.
- Kronsteiner B, Wolbank S, Peterbauer A, Hackl C, Redl H, van Griensven M *et al*. Human mesenchymal stem cells from adipose tissue and amnion influence T-cells depending on stimulation method and presence of other immune cells. *Stem Cells Dev* 2011; **20**: 2115–2126.
- Ding Y, Xu D, Feng G, Bushell A, Muschel RJ, Wood KJ. Mesenchymal stem cells prevent the rejection of fully allogeneic islet grafts by the immunosuppressive activity of matrix metalloproteinase-2 and -9. *Diabetes* 2009; **58**: 1797–1806.
- Park M-J, Shin J-S, Kim Y-H, Hong S-H, Shin J-Y *et al*. Murine mesenchymal stem cells suppress T lymphocyte activation through IL-2 receptor α (CD25) cleavage by producing matrix metalloproteinases. *Stem Cell Rev* 2011; **7**: 381–393.
- Benson HL, Mobashery S, Chang M, Kheradmand F, Hong JS, Smith GN *et al*. Endogenous matrix metalloproteinases 2 and 9 regulate activation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2011; **44**: 700–708.
- Najar M, Raicevic G, Boufker HI, Fayyad Kazan H, De Bruyn C, Meuleman N *et al*. Mesenchymal stromal cells use PGE2 to modulate activation and proliferation of lymphocyte subsets: combined comparison of adipose tissue, Wharton's jelly and bone marrow sources. *Cell Immunol* 2010; **264**: 171–179.
- Fallarino F, Grohmann U, You S, McGrath BC, Cavener DR, Vacca C *et al*. The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. *J Immunol Baltim Md 1950* 2006; **176**: 6752–6761.
- Yan Z, Zhuansun Y, Chen R, Li J, Ran P. Immunomodulation of mesenchymal stromal cells on regulatory T cells and its possible mechanism. *Exp Cell Res* 2014; **324**: 65–74.
- Luz-Crawford P, Kurte M, Bravo-Alegria J, Contreras R, Nova-Lamperti E, Tejedor G *et al*. Mesenchymal stem cells generate a CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ regulatory T cell population during the differentiation process of Th1 and Th17 cells. *Stem Cell Res Ther* 2013; **4**: 65.
- Melief SM, Schrama E, Brugman MH, Tiemessen MM, Hoogduijn MJ, Fibbe WE *et al*. Multipotent stromal cells induce human regulatory T cells through a novel pathway involving skewing of monocytes toward anti-inflammatory macrophages. *Stem Cells* 2013; **31**: 1980–1991.
- Chatterjee D, Tufa DM, Baehre H, Hass R, Schmidt RE, Jacobs R. Natural killer cells acquire CD73 expression upon exposure to mesenchymal stem cells. *Blood* 2014; **123**: 594–595.
- Lee B-K, Kim M-J, Jang H-S, Lee H-R, Ahn K-M, Lee J-H *et al*. A high concentration of MMP-2/gelatinase A and MMP-9/gelatinase B reduce NK cell-mediated cytotoxicity against an oral squamous cell carcinoma cell line. *Vivo Athens Greece* 2008; **22**: 593–597.
- Grzywacz B, Kataria N, Verneris MR. CD56(dim)CD16(+) NK cells downregulate CD16 following target cell induced activation of matrix metalloproteinases. *Leukemia* 2007; **21**: 356–359. author reply 359.
- Harrison D, Phillips JH, Lanier LL. Involvement of a metalloprotease in spontaneous and phorbol ester-induced release of natural killer cell-associated Fc gamma RIII (CD16-II). *J Immunol Baltim Md 1950* 1991; **147**: 3459–3465.
- Hu Y, Davison F, Zhang Z, Xu Q. Endothelial replacement and angiogenesis in arteriosclerotic lesions of allografts are contributed by circulating progenitor cells. *Circulation* 2003; **108**: 3122–3127.
- Nowak G, Karrar A, Holmén C, Nava S, Uzunel M, Hultenby K *et al*. Expression of vascular endothelial growth factor receptor-2 or Tie-2 on peripheral blood cells defines functionally competent cell populations capable of reendothelialization. *Circulation* 2004; **110**: 3699–3707.
- Chen M-Y, Lie P-C, Li Z-L, Wei X. Endothelial differentiation of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp Hematol* 2009; **37**: 629–640.
- Vater C, Kasten P, Stiehler M. Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells. *Acta Biomater* 2011; **7**: 463–477.
- Prasad Chennazhy K, Krishnan LK. Effect of passage number and matrix characteristics on differentiation of endothelial cells cultured for tissue engineering. *Biomaterials* 2005; **26**: 5658–5667.
- La Rocca G, Lo Iacono M, Corsello T, Corrao S, Farina F, Anzalone R. Human Wharton's jelly mesenchymal stem cells maintain the expression of key immunomodulatory

- molecules when subjected to osteogenic, adipogenic and chondrogenic differentiation in vitro: new perspectives for cellular therapy. *Curr Stem Cell Res Ther* 2013; **8**: 100–113.
- 43 Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 2004; **25**: 581–611.
- 44 Oswald J, Boxberger S, Jørgensen B, Feldmann S, Ehninger G, Bornhäuser M *et al*. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells Dayt Ohio* 2004; **22**: 377–384.
- 45 Niwa K, Kado T, Sakai J, Karino T. The effects of a shear flow on the uptake of LDL and acetylated LDL by an EC monoculture and an EC-SMC coculture. *Ann Biomed Eng* 2004; **32**: 537–543.
- 46 Fischer LJ, McIlhenny S, Tulenko T, Golesorkhi N, Zhang P, Larson R *et al*. Endothelial differentiation of adipose-derived stem cells: effects of endothelial cell growth supplement and shear force. *J Surg Res* 2009; **152**: 157–166.
- 47 Montespan F, Deschaseaux F, Sensébé L, Carosella ED, Rouas-Freiss N. Osteodifferentiated mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue express HLA-G and display immunomodulatory properties in HLA-mismatched settings: implications in bone repair therapy. *J Immunol Res* 2014; **2014**: e230346.
- 48 Duffner UA, Maeda Y, Cooke KR, Reddy P, Ordemann R, Liu C *et al*. Host dendritic cells alone are sufficient to initiate acute graft-versus-host disease. *J Immunol Baltim Md 1950* 2004; **172**: 7393–7398.
- 49 Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis AD, Baxevasis CN, Papamichail M. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells Dayt Ohio* 2006; **24**: 74–85.
- 50 Castro-Manrreza ME, Mayani H, Monroy-García A, Flores-Figueroa E, Chávez-Rueda K, Legorreta-Haquet V *et al*. Human mesenchymal stromal cells from adult and neonatal sources: a comparative *in vitro* analysis of their immunosuppressive properties against T cells. *Stem Cells Dev* 2014; **23**: 1217–1232.
- 51 Chinnadurai R, Copland IB, Patel SR, Galipeau J. IDO-independent suppression of T cell effector function by IFN- γ -licensed human mesenchymal stromal cells. *J Immunol* 2014; **192**: 1491–1501.
- 52 Le Blanc K, Rasmusson I, Götherström C, Seidel C, Sundberg B, Sundin M *et al*. Mesenchymal stem cells inhibit the expression of CD25 (interleukin-2 receptor) and CD38 on phytohemagglutinin-activated lymphocytes. *Scand J Immunol* 2004; **60**: 307–315.
- 53 Di Ianni M, Del Papa B, De Ioanni M, Moretti L, Bonifacio E, Cecchini D *et al*. Mesenchymal cells recruit and regulate T regulatory cells. *Exp Hematol* 2008; **36**: 309–318.
- 54 Luan X, Li G, Wang G, Wang F, Lin Y. Human placenta-derived mesenchymal stem cells suppress T cell proliferation and support the culture expansion of cord blood CD34⁺ cells: a comparison with human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Cell* 2013; **45**: 32–38.
- 55 Tipnis S, Viswanathan C, Majumdar AS. Immunosuppressive properties of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: role of B7-H1 and IDO. *Immunol Cell Biol* 2010; **88**: 795–806.
- 56 Manochantr S, U-pratya Y, Kheolamai P, Rojphisan S, Chayosumrit M, Tantrawatpan C *et al*. Immunosuppressive properties of mesenchymal stromal cells derived from amnion, placenta, Wharton's jelly and umbilical cord. *Intern Med J* 2013; **43**: 430–439.
- 57 Parks WC, Wilson CL, López-Boado YS. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2004; **4**: 617–629.
- 58 Nissinen L, Kähäri V-M. Matrix metalloproteinases in inflammation. *Biochim Biophys Acta* 2014; **1840**: 2571–2580.
- 59 Selmani Z, Naji A, Zidi I, Favier B, Gaiffe E, Obert L *et al*. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ regulatory T cells. *Stem Cells Dayt Ohio* 2008; **26**: 212–222.
- 60 Maccario R, Podestà M, Moretta A, Cometa A, Comoli P, Montagna D *et al*. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4⁺ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica* 2005; **90**: 516–525.
- 61 English K, Ryan JM, Tobin L, Murphy MJ, Barry FP, Mahon BP. Cell contact, prostaglandin E2 and transforming growth factor beta 1 play non-redundant roles in human mesenchymal stem cell induction of CD4⁺CD25^{high}forkhead box P3⁺ regulatory T cells. *Clin Exp Immunol* 2009; **156**: 149–160.
- 62 Lu L, Feng M, Gu J, Xia Z, Zhang H, Zheng S *et al*. Restoration of intrahepatic regulatory T cells through MMP-9/13-dependent activation of TGF- β is critical for immune homeostasis following acute liver injury. *J Mol Cell Biol* 2013; **5**: 369–379.
- 63 Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P *et al*. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 2002; **99**: 3838–3843.
- 64 Cao Y, Sun Z, Liao L, Meng Y, Han Q, Zhao RC. Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; **332**: 370–379.
- 65 Ganesh BB, Bhattacharya P, Gopisetty A, Sheng J, Vasu C, Prabhakar BS. IL-1 β promotes TGF- β 1 and IL-2 dependent Foxp3 expression in regulatory T cells. *PLoS ONE* 2011; **6**: e21949.
- 66 Afzali B, Mitchell PJ, Edozie FC, Povolieri GAM, Dowson SE, Demandt L *et al*. CD161 expression characterizes a subpopulation of human regulatory T cells that produces IL-17 in a STAT3-dependent manner. *Eur J Immunol* 2013; **43**: 2043–2054.
- 67 Curran T-A, Jalili RB, Farrokhi A, Ghahary A. IDO expressing fibroblasts promote the expansion of antigen specific regulatory T cells. *Immunobiology* 2014; **219**: 17–24.
- 68 Chung DJ, Rossi M, Romano E, Ghith J, Yuan J, Munn DH *et al*. Indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing mature human monocyte-derived dendritic cells expand potent autologous regulatory T cells. *Blood* 2009; **114**: 555–563.
- 69 Park M-J, Min S-Y, Park K-S, Cho Y-G, Cho M-L, Jung Y-O *et al*. Indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells are involved in the generation of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in Peyer's patches in an orally tolerized, collagen-induced arthritis mouse model. *Arthritis Res Ther* 2008; **10**: R11.
- 70 Curti A, Pandolfi S, Valzania B, Aluigi M, Isidori A, Ferri E *et al*. Modulation of tryptophan catabolism by human leukemic cells results in the conversion of CD25⁺ into CD25⁺ T regulatory cells. *Blood* 2007; **109**: 2871–2877.
- 71 Kalinski P. Regulation of immune responses by prostaglandin E2. *J Immunol Baltim Md 1950* 2012; **188**: 21–28.
- 72 Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood* 2008; **111**: 1327–1333.
- 73 Litzenburger UM, Opitz CA, Sahn F, Rauschenbach KJ, Trump S, Winter M *et al*. Constitutive IDO expression in human cancer is sustained by an autocrine signaling loop involving IL-6, STAT3 and the AHR. *Oncotarget* 2014; **5**: 1038–1051.
- 74 Chauveau A, Tonnerre P, Pabois A, Gavlovsky P-J, Chatelais M, Coupel S *et al*. Endothelial cell activation and proliferation modulate NKG2D activity by regulating MICA expression and shedding. *J Innate Immun* 2014; **6**: 89–104.
- 75 Hoskin DW, Mader JS, Furlong SJ, Conrad DM, Blay J. Inhibition of T cell and natural killer cell function by adenosine and its contribution to immune evasion by tumor cells (Review). *Int J Oncol* 2008; **32**: 527–535.
- 76 Häusler SFM, Montalbán del Barrio I, Strohschein J, Anoop Chandran P, Engel JB, Hönig A *et al*. Ectonucleotidases CD39 and CD73 on OvCA cells are potent adenosine-generating enzymes responsible for adenosine receptor 2A-dependent suppression of T cell function and NK cell cytotoxicity. *Cancer Immunol Immunother* 2011; **60**: 1405–1418.
- 77 Petsa A, Gargani S, Felesakis A, Grigoriadis N, Grigoriadis I. Effectiveness of protocol for the isolation of Wharton's Jelly stem cells in large-scale applications. *Vitro Cell Dev Biol Anim* 2009; **45**: 573–576.
- 78 Harmouch C, El-Omar R, Labrude P, Decot V, Menu P, Kerdjoudj H. Influence of serum percentage on the behavior of Wharton's jelly mesenchymal stem cells in culture. *Biomed Mater Eng* 2013; **23**: 273–280.
- 79 Xu Y, Meng H, Li C, Hao M, Wang Y, Yu Z *et al*. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells isolated by a novel explantation technique can differentiate into functional endothelial cells and promote revascularization. *Stem Cells Dev* 2010; **19**: 1511–1522.
- 80 Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 1973; **52**: 2745–2756.
- 81 Doan CC, Le TL, Hoang NS, Doan NT, Le VD, Si, Do M. Differentiation of umbilical cord lining membrane-derived mesenchymal stem cells into endothelial-like cells. *Iran Biomed J* 2014; **18**: 67–75.
- 82 Decot V, Voillard L, Latger-Cannard V, Aissi-Rothé L, Perrier P, Stoltz JF *et al*. Natural-killer cell amplification for adoptive leukemia relapse immunotherapy: comparison of three cytokines, IL-2, IL-15, or IL-7 and impact on NKG2D, KIR2DL1, and KIR2DL2 expression. *Exp Hematol* 2010; **38**: 351–362.
- 83 Poleni P-E, Etienne S, Velot E, Netter P, Bianchi A. Activation of PPARs α , β / δ , and γ impairs TGF- β 1-induced collagens' production and modulates the TIMP-1/MMPs balance in three-dimensional cultured chondrocytes. *PPAR Res* 2010; **2010**: 635912.
- 84 Ernens I, Rouy D, Velot E, Devaux Y, Wagner DR. Adenosine inhibits matrix metalloproteinase-9 secretion by neutrophils: implication of A2a receptor and cAMP/PKA/Ca²⁺ pathway. *Circ Res* 2006; **99**: 590–597.

The Supplementary Information that accompanies this paper is available on the Immunology and Cell Biology website (<http://www.nature.com/icb>)

ABSTRACT

The ability of natural killer (NK) cells to kill tumor cells without the need to recognize a tumor-specific antigen provides advantages over T cells and makes them appealing for a use as effectors for adoptive immunotherapy. However, the full therapeutic potential of NK cell-based immunotherapy has not been fully investigated in the context of leukemic relapse after hematopoietic stem cell transplantation. Today, patients relapsing after hematopoietic stem cell transplantation are often treated with donor lymphocyte infusion (DLI) based on small cell fractions frozen at the time of the stem cell transplantation. Since peripheral blood stem cells are increasingly used as stem cell source and as source of cells for DLI, we aimed to evaluate the impact of G-CSF mobilization on NK cell phenotype and functions. Therefore, we compared the expansion capacity, the phenotype and the function of NK cells from blood for healthy donors, from allogeneic HSCT healthy donors or from autologous HSCT from patients. We also determine the impact of G-CSF on NK cell subset repartition before and after expansion in presence of IL-15. Our results showed that G-CSF administration to patients decreases CD56^{bright}CD16⁺ NK cell population, proliferation and function. Overcoming this impairment in lymphoid capacity may be important to facilitate post-transplant immunotherapy.

Keywords: granulocyte-colony stimulating factor; natural killer cells; expansion; cytotoxicity; immunotherapy.

RÉSUMÉ

Les cellules Natural Killer (NK) sont capables de lyser les cellules tumorales sans la nécessité de reconnaître un antigène tumoral spécifique. Cette propriété leur confère un avantage par rapport aux lymphocytes T et les rend intéressantes à utiliser en tant que cellules effectrices pour l'immunothérapie adoptive. A ce jour, le potentiel thérapeutique des cellules NK n'a pas été complètement exploré notamment dans le contexte du traitement de la rechute post-allogreffe de cellules souches hématopoïétiques. Actuellement, les patients en rechute post-greffe sont traités avec des injections de lymphocytes du donneur (DLI) parfois issues de petites fractions du greffon de cellules souches hématopoïétiques congelées. Les cellules souches périphériques étant fréquemment utilisées comme source de cellules souches et parfois utilisées comme DLI, nous avons souhaité évaluer l'impact du G-CSF sur le phénotype et les fonctions des cellules NK présentes dans ces fractions. Dans cet objectif, nous avons comparé différentes sources de cellules NK isolées à partir de sang de donneurs sains, de sang mobilisé de donneurs sains ou de patients et observé l'évolution des différentes sous-populations de cellules NK issues de ces prélèvements au décours d'une expansion en présence d'IL-15. Nos résultats ont montré que l'administration de G-CSF diminuait la proportion de cellules NK CD56^{bright}CD16⁺ au profit d'une population CD16⁻, diminuait la prolifération des cellules NK lors de l'expansion en culture, et modifiait les propriétés fonctionnelles des cellules NK.

Mots clés: *granulocyte-colony stimulating factor*; cellules NK; expansion; cytotoxicité; immunothérapie.