

UNIVERSITE DE LILLE II

Ecole Doctorale Biologie et Santé de Lille

THESE

Présentée pour l'obtention du grade de :

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE II

Par

Céline BERTHON

Le 17 septembre 2012

MECANISMES D'IMMUNOEVASION DANS LES LEUCEMIES AIGUES MYELOIDES :
LA MOLECULE B7

Jury

Président : **Monsieur le Professeur Jean-Pierre JOUET**

Rapporteurs : **Monsieur le Professeur Eric WATTEL**

Monsieur le Professeur Christian RECHER

Examineur : **Monsieur le Professeur Jean- Pierre MAROLLEAU**

Directeur : **Monsieur le Professeur Bruno QUESNEL**

Sommaire

LISTE DES ABREVIATIONS	3
LISTE DES FIGURES	4
LISTE DES TABLEAUX	5
LISTE DES PUBLICATIONS.....	6
INTRODUCTION	7
CHAPITRE 1	10
GENERALITES	10
I. <i>Mécanismes d'immunoévasion</i>	11
a. Généralités	11
b. L'immunoévasion dans les leucémies aiguës myéloïdes.....	18
II. <i>La Famille B7</i>	28
a. Généralités.....	28
b. Structure.....	31
c. Description des membres de cette famille	33
d. Fonctions.....	34
III. <i>La molécule B7-H1</i>	39
a. Structure et expression.....	39
b. Récepteur PD-1	46
c. Interaction B7-H1 et B7.1	48
d. B7-H1 et hémopathies	50
Lymphomes et leucémie lymphoïde chronique	50
Myélome multiple (MM).....	52
Leucémie aiguë et syndromes myélodysplasiques	54
Allogreffes de cellules souches hématopoïétiques	55
e. Les mécanismes d'action immunologique.....	57
f. Les mécanismes non immunologiques	65
IV. <i>IDO</i>	69
a. Généralités.....	69
b. IDO et LAM.....	73
CHAPITRE 2	74
RESULTATS.....	74
Première partie :.....	75
Etude de l'expression de la molécule B7-H1 sur les blastes de LAM et fonction immunologique sur les lymphocytes T cytotoxiques.....	75
Deuxième partie:.....	77
Implication de la molécule B7-H1 dans la résistance aux chimiothérapies (Résultats provisoires)...	77
Introduction.....	77
Matériel et méthodes :	78
Résultats	82
Discussion	87
Troisième partie :	89
Dosages de métabolites de la kynurénine dans les syndromes myélodysplasiques et corrélation clinico-biologiques : influence sur les cytopénies.....	89
CHAPITRE 3	90
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	90
Conclusion.....	98
CHAPITRE IV.....	99
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	99

Liste des abréviations

AP-1: activator protein 1	MGUS: Monoclonal gammopathy of undetermined significance
Bcl1: B-cell leukemia/lymphoma 1	MyD88: Myeloid differentiation primary response gene 88
CMH: complexe majeur histocompatibilité	NAD: nicotinamide adenine dinucléotide
CHO: Chinese Hamster Ovary	NCR: natural cytotoxicity receptors
CLIP: Classe II associated invariant chain	NPM 1: Nucleophosmin
DC: cellules dendritiques	NK: Natural killer
EAE: Experimental Allergic Encephalomyelitis	ODN: oligo desoxy nucleotide
EBV: Epstein bar virus	RHAMM: receptor for hyaluronan-mediated motility
GCB: Germinal center B cell	STAT3: Signal transducer and activator of transcription 3
FISH: fluorescence in situ hybridation	TDO: tryptophan 2,3-dioxygenase
GVHD: graft versus host disease:	TIL: tumor infiltrate lymphocyte
GVL: graft versus leukemia	TNF: tumor necrosis factor
HHV8: Human Herpes Virus - 8	TLR: Toll Like Receptor
HPLC: high performance liquid chromatography	MCA: methylcholanthrène
HPV: human parvovirus	MDSCS: Myeloid-derived suppressor cells
IDO: Indoleamine 2, 3-dioxygenase	RAG1: recombination activating gene
Ig C et Ig V: immunoglobuline commune et variable	SMD: syndrome myélodysplasique
ITSM: immunoreceptor tyrosine-based switch motif	TGF-b: Transforming growth factor beta
LAM : leucémie aigue myéloïde	TRAIL: TNF Related Apoptosis Inducing Ligand
LMP2 : latent membrane protein 2	T reg: T regulator
LMP7 : latent membrane protein 7	VEGF: vascular epithelium growth factor
LPS : lipopolysaccharides	

Liste des figures

Figure N°1 : Survie globale au cours du temps des patients atteints de LAM : de 15 à 59 ans (A) et de plus de 60 ans (B).....	8
Figure N°2 : Les 3 phases de l'immunoediting.....	17
Figure N°3 : Mécanismes d'immunoévasion des blastes de LAM.....	20
Figure N°4 : Implication des NK dans l'évasion tumorale des LAM	21
Figure N°5 : La synapse immunologique.....	29
Figure N°6 : Activation des lymphocytes T.....	30
Figure N°7 : Les différents membres de la famille B7 et leur récepteur.....	32
Figure N°8 : Structure du gène Cd274.....	40
Figure N°9 : Structure de la molécule B7-H1.....	40
Figure N°10 : Ligands des TLR.....	42
Figure N°11 : Voies de signalisation des TLR	43
Figure N°12 : Régulation du système inné et adaptatif par la production de facteurs pro inflammatoires suite à la stimulation des TLR.....	44
Figure N°13 : Structure de PD-1.....	47
Figure N° 14 : Interaction entre B7-H1 et B7.1.....	49
Figure N°15 : Mécanismes d'expression de B7-H1 dans les lymphomes de Hodgkin.....	51
Figure N°16 : Voies de signalisation de B7-H1 dans les myélomes multiples.....	53
Figure N°17 : Action inhibitrice de B7-H1 dans l'immunoévasion	59
Figure N°18 : Modèle DA1-3b de dormance tumorale	62
Figure N°19 : Hypothèses des mécanismes de survie des cellules dormantes.....	63
Figure N°20 : Hypothèse d'une fonction anti apoptotique de B7-H1 dans les cellules tumorales	66
Figure N°21 : Proposition d'implication de la molécule B7-H1 dans la progression tumorale	67
Figure N°22 : Les différents métabolites de la kynurénine.....	70

Figure N° 23 : Régulation de l'activation de l'IDO.....	71
Figure N°24 : Système inductible IPTG. A plasmide répresseur. B plasmide d'intérêt avec B7-H1	79
Figure N° 25 : Coatage de plaques	80
Figure N° 26 : Modèle in vivo.....	81
Figure N°27 : Inductibilité des clones B7-H1.....	82
Figure N°28 : Tests MTT sur les différents clones DA1-3B B7-H1.....	83
Figure N°29 : Interaction de B7-H1 et PD-1 et B7-H1 et B7.1.....	84
Figure N°30 : Résultat du modèle in vivo.....	86
Figure N°31 : Hypothèse de l'implication des TLR et B7-H1 dans la dormance tumorale...	93

Liste des tableaux

Tableau N°1 : Essais d'immunothérapie dans les LAM.....	26
Tableau N°2 : Expression des différents membres de la famille B7 avec leur récepteur et leurs fonctions.....	37
Tableau N°3 : Expression des différents membres de la famille B7-H sur les tumeurs solides.....	38
Tableau N° 4 : Expression de la molécule B7-H1 sur les cellules tumorales des hémopathies	56

Liste des publications

Berthon C, Driss V, Liu J, Kuranda K, Leleu X, Jouy N, Hetuin D, Quesnel B. In acute myeloid leukemia, B7-H1 (PD-L1) protection of blasts from cytotoxic T cells is induced by TLR ligands and interferon-gamma and can be reversed using MEK inhibitors. *Cancer Immunol Immunother.* 2010 Dec;59(12):1839-49.

Kuranda K, Berthon C, Dupont C, Wolowiec D, Leleu X, Polakowska R, Jouy N, Quesnel B. A subpopulation of malignant CD34+CD138+B7-H1+ plasma cells is present in multiple myeloma patients. *Exp Hematol.* 2010 Feb;38(2):124-31. Epub 2009 Dec 3.

Corm S, Berthon C, Imbenotte M, Biggio V, Lhermitte M, Dupont C, Briche I, Quesnel B. Indoleamine 2,3-dioxygenase activity of acute myeloid leukemia cells can be measured from patients' sera by HPLC and is inducible by IFN-gamma. *Leuk Res.* 2009 Mar;33(3):490-4.

Delestré L, Berthon C, Quesnel B, Figeac M, Kerckaert JP, Galiègue-Zouitina S, Shelley C. Repression of the RHOH gene by JunD. *Biochem J.* 2011 Apr 8. [Epub ahead of print]

Kuranda K, Berthon C, Leprêtre F, Polakowska R, Jouy N, Quesnel B. Expression of CD34 in hematopoietic cancer cell lines reflects tightly regulated stem/progenitor-like state. *J Cell Biochem.* 2011 May;112(5):1277-85. doi: 10.1002/jcb.23026.

Joha S, Nugues AL, Héтуin D, Berthon C, Dezitter X, Dauphin V, Mahon FX, Roche-Lestienne C, Preudhomme C, Quesnel B, Idziorek T. GILZ inhibits the mTORC2/AKT pathway in BCR-ABL(+) cells. *Oncogene.* 2011 Aug 1. doi: 10.1038/onc.2011.328.

Renneville A, Boissel N, Nibourel O, Berthon C, Helevaut N, Gardin C, Cayuela JM, Hayette S, Reman O, Contentin N, Bordessoule D, Pautas C, Botton SD, Revel TD, Terre C, Fenaux P, Thomas X, Castaigne S, Dombret H, Preudhomme C. Prognostic significance of DNA methyltransferase 3A mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a study by the Acute Leukemia French Association. *Leukemia.* 2012 Jan 13. doi: 10.1038/leu.2011.382.

Itzykson R, Thépot S, Beyne-Rauzy O, Ame S, Isnard F, Dreyfus F, Salanoubat C, Taksin AL, Chelgoum Y, Berthon C, Malfuson JV, Legros L, Vey N, Turlure P, Gardin C, Boehrer S, Ades L, Fenaux P; on behalf of the Groupe Francophone des Myelodysplasies (GFM). Does addition of erythropoiesis stimulating agents improve the outcome of higher-risk myelodysplastic syndromes treated with azacitidine? *Leuk Res.* 2011 Dec 15. [Epub ahead of print]

Abdelhamid E, Preudhomme C, Helevaut N, Nibourel O, Gardin C, Rousselot P, Castaigne S, Gruson B, Berthon C, Soua Z, Renneville A. Minimal residual disease monitoring based on FLT3 internal tandem duplication in adult acute myeloid leukemia. *Leuk Res.* 2011 Nov 28. [Epub ahead of print]

Renneville A, Boissel N, Helevaut N, Nibourel O, Terré C, Pautas C, Gardin C, Thomas X, Turlure P, Reman O, Berthon C, Dombret H, Castaigne S, Preudhomme C. Wilms' tumor 1 single-nucleotide polymorphism rs16754 does not predict clinical outcome in adult acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2011 Dec;25(12):1918-21

INTRODUCTION

La prise en charge initiale par polychimiothérapie des leucémies aigues myéloïdes (LAM) permet l'obtention d'une rémission complète dans 70 à 80 % des cas. Néanmoins, les rechutes sont fréquentes de 50 à 55% chez les sujets jeunes même après une intensification thérapeutique par allogreffe de cellules souches hématopoïétiques et jusqu'à 85% chez les sujets âgés [1]. La survie à 5 ans des sujets jeunes est de moins de 50% et pour les sujets âgés de moins de 20% (*Figure N°1*). Lors de la rechute, les cellules leucémiques ont une résistance accrue aux réponses immunes, autologues ou allogéniques. Une meilleure connaissance des interactions entre cellules leucémiques et système immunitaire est fondamentale pour mieux appréhender les mécanismes de résistance aux traitements et proposer ainsi de nouvelles solutions thérapeutiques.

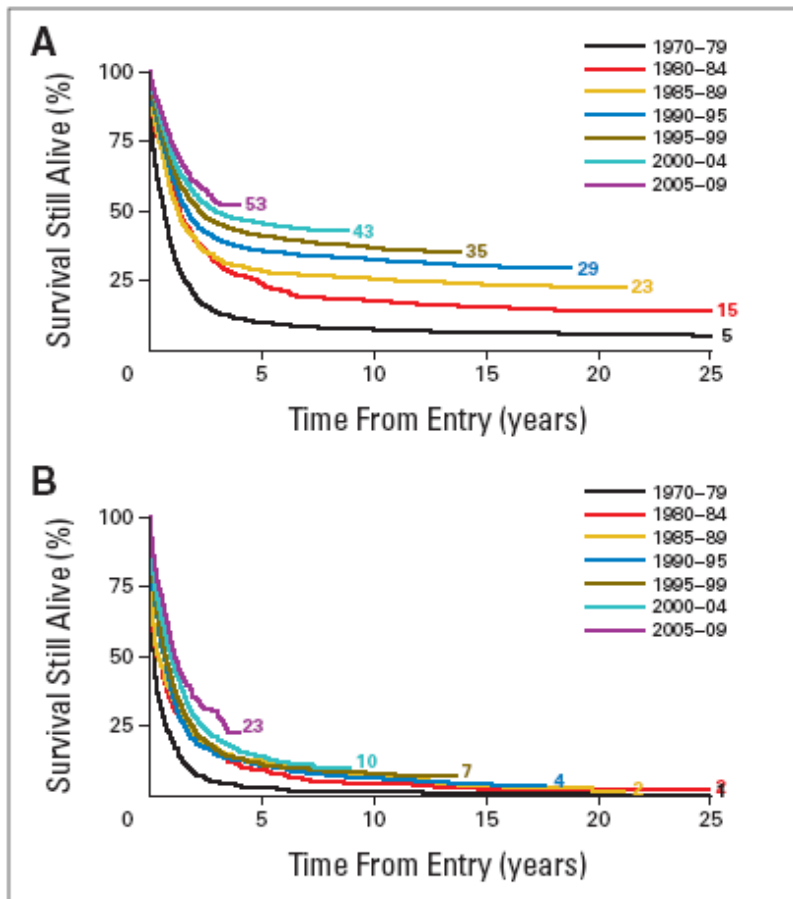


Figure N°1 : Survie globale au cours du temps des patients atteints de LAM : de 15 à 59 ans (A) et de plus de 60 ans (B) [1].

L'échappement des cellules leucémiques au système immunitaire met en jeu, entre autres, des molécules de costimulation de la famille B7, qui participent à l'immunoévasion. La molécule B7-H1 contribue ainsi à l'inhibition de la lyse des cellules tumorales par les lymphocytes T cytotoxiques.

Dans la première partie de ce manuscrit, nous étudierons l'expression de la molécule B7-H1 dans des lignées murines et humaines leucémiques. Nous rapporterons également son expression dans les cellules de patients leucémiques (79 cas de LAM), au diagnostic ou à la rechute. Nous étudierons enfin le rôle immunologique de B7-H1 sur les lymphocytes cytotoxiques.

L'équipe de Ghebeh a récemment montré que les molécules de costimulation de la famille B7 avaient également des fonctions non immunologiques [2]. Elles pourraient ainsi interférer dans la réponse aux chimiothérapies. Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons évalué l'implication de la molécule B7-H1 dans les mécanismes de résistance aux chimiothérapies

Enfin, dans la troisième partie de ce travail, nous étudierons différents métabolites de la kynurénine: acide kynurénique, 3OH kynurénine, l'acide anthranilyque et l'acide 3OH anthranilyque. Ces métabolites sont dérivés du métabolisme du tryptophane par l'indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO). Nous avons exposé des progéniteurs normaux cultivés en milieu liquide ou semi solide à ces métabolites pour en évaluer leur impact clinicobiologique.

CHAPITRE 1

GENERALITES

I. Mécanismes d'immunoévasion

a. Généralités

Le concept d'immunosurveillance a d'abord été décrit par Macfarlane Burnet et Lewis Thomas en 1957 [3]. Il a rapidement été abandonné devant l'absence de preuves suffisantes.

Le travail de Medawar a ensuite permis de clarifier le rôle du système immunologique dans le rejet des allogreffes [4]. Le système immunitaire est en effet capable de reconnaître et de détruire des cellules tumorales transplantées. Grâce à ce travail, des antigènes tumoraux ont commencé à être mis en évidence [5-6]. A partir de ce concept, de nombreuses expériences ont été menées : les auteurs ont testé l'implication du système immunitaire dans l'apparition des tumeurs, suite à différentes stimulations (virales ou chimiques).

Les premières observations rapportent que la réalisation de thymectomies néonatales n'a pas entraîné de développement tumoral [7]. Ensuite il est montré qu'il existe une augmentation des néoplasies chez des sujets traités par immunosuppresseurs, et exposés à différentes stimulations virales [7-8]. Le travail de Stutman sur les souris « nude » a cependant mis à mal le concept d'immunosurveillance. Ainsi, l'injection de carcinogène (MCA Methylcholanthrene) chez ces souris avec un système immunitaire déficient n'augmente ni l'incidence des tumeurs ni la vitesse de développement de celles-ci, et cela quelque soit la dose du carcinogène ou l'âge des souris [9]. Nous savons aujourd'hui que les souris nude ne sont pas complètement immunodéficientes. Elles possèdent encore des lymphocytes T. De plus, le MCA est à considérer comme une prodrogue, il doit être métabolisé par une enzyme : la hydroxycarbonylase afin d'activer ses propriétés carcinogènes. Les souris utilisées dans ces expériences (CBA/H) ont une activité enzymatique très importante. La transformation cellulaire induite par le carcinogène dépasse donc les défenses immunologiques des souris. Le concept d'immunosurveillance ne pouvait donc pas être mis en évidence.

Ce n'est qu'entre 1970 et 1990 que le concept d'immunosurveillance se développe de nouveau, avec la découverte des cellules NK et de leur rôle dans l'apparition de tumeurs [10]. Les expériences de Stutman sont réalisées avec un nouveau type de souris (BALB/Bc et CB-17 SCID) et cette fois-ci il existe bien une augmentation du nombre de tumeurs chez les souris «SCID» avec une plus grande rapidité d'apparition [11].

Entre 1994 et 1998, deux découvertes ont permis d'avancer sur le concept d'immunosurveillance.

Tout d'abord, il a été montré que l'IFN- γ protège l'organisme du développement des tumeurs. Ainsi, l'utilisation d'anticorps monoclonaux anti IFN- γ augmente la vitesse de croissance des tumeurs chez la souris [12]. Les souris KO pour le récepteur à l'IFN- γ ou le transducteur du signal STAT1 sont 10 à 20 fois plus sensibles au carcinogène MCA [13]. Cette sensibilité aux carcinogènes est également retrouvée chez les souris déficitaires en IFN- γ [14].

La deuxième découverte concerne le déficit en perforine. Les souris C57BL/6 déficitaires en perforine sont plus sensibles au MCA [14-16]. La perforine est une enzyme contenue dans les granulations cytotoxiques des lymphocytes T et des cellules NK. Elle joue un rôle important dans la destruction de différentes cibles dont les cellules tumorales [17].

Le dernier travail, qui a conforté l'idée d'immunosurveillance, est la découverte de RAG 1 et 2 (recombination activating gene). Cette enzyme intervient dans la réparation de l'ADN double brin, elle s'exprime uniquement dans le compartiment lymphoïde. Les souris déficitaires pour ces deux gènes (RAG-/-) ne peuvent pas réarranger leur récepteurs et sont donc complètement déficitaires en lymphocytes B, T et NK. Ces souris développent un nombre plus élevé de tumeurs de manière spontanée au niveau épithélial ou après stimulation par le MCA que les souris non déficitaires [18]. Chez la souris, les lymphocytes B, T et les NK ont donc un rôle protecteur dans l'apparition de tumeurs spontanées ou chimio-induites.

Chez l'homme, le concept d'immunosurveillance a d'abord été évoqué devant l'augmentation de l'incidence de tumeurs chez les patients immunodéprimés (greffés, VIH) [19-20]. Pour certaines tumeurs, une étiologie virale est retrouvée (EBV, HHV8, HPV) [21], cela n'est néanmoins pas le cas pour toutes les tumeurs survenant chez l'immunodéprimé. Ainsi le fait que l'on observe une augmentation de l'incidence de mélanomes ou de néoplasies pulmonaires chez des patients greffés est en faveur de l'hypothèse d'une immunosurveillance [22]-[23]. En plus de ces données épidémiologiques, certains auteurs ont également montré une corrélation entre le taux de lymphocytes qui infiltrent une biopsie de mélanome (TIL) et la survie de l'individu. Plus la biopsie retrouve des TIL, plus la survie est importante [24-25]. Les mêmes résultats ont été obtenus dans les cancers du sein et du colon [26-27]. Il existe donc bien un contrôle immunologique dans le développement tumoral.

Cette immunosurveillance n'est pas néanmoins complète : on note bien sûr l'apparition de tumeurs chez des sujets immunocompétents, même si l'incidence de celles-ci est plus faible. Dans un modèle de sarcome induit par du MCA, l'incidence tumorale est de 40% chez les souris immunocompétentes et de 100% chez les souris KO RAG-2. Enfin, les tumeurs qui surviennent dans un modèle immunodéprimé sont aussi plus tumorigènes, c'est-à-dire plus agressives. Il existe donc un modelage de la tumeur par le milieu environnant, qu'on peut appeler « immunoediting ».

Il est possible de modéliser l'immunoediting en 3 phases : élimination, équilibre et échappement (*Figure N°2*).

La phase d'élimination :

Dans cette phase, les cellules du système immunitaire reconnaissent et détruisent les cellules tumorales. Cette étape n'a jamais été visualisée in vivo mais est déduite de modèles murins immunodéficients.

L'utilisation d'anticorps monoclonaux neutralisant différents effecteurs a permis de mettre en évidence l'implication de nombreuses molécules et intervenants tel que Rag 1^{-/-} [18, 28], Stat 1^{-/-} [13, 18] TRAIL^{-/-} [29], MyD88^{-/-} [30-31] mais également les cellules de l'immunité innée et acquise interviennent dans cette phase. Les souris présentant un déficit en lymphocytes Rag^{-/-} sont très sensibles au MCA [18, 28, 32]. De plus, les tumeurs développées dans ces souris déficientes sont rejetées chez les souris immunocompétentes. Par contre ces tumeurs peuvent se développer chez des souris déficitaires en CD4⁺ ou CD8⁺ isolé [18]. Les souris déficientes en récepteur alpha beta T ou gamma delta T sont plus sensibles aux carcinogènes [33-34]. Il en est de même pour les souris déficientes en cellules NK [28]. D'autres cellules interviennent dans la phase d'élimination, c'est le cas des éosinophiles. Les souris déficientes en éosinophiles sont aussi plus sensibles aux carcinogènes [35].

En dehors des cellules T, NK et des éosinophiles de nombreuses molécules interviennent également dans la phase d'élimination. La liste de ces molécules est longue, on peut retenir : la perforine [14], l'IFN- γ [14], le récepteur à l'IFN [30, 36], l'IL-12 [37], le TNF- α [30]. Récemment, le rôle de l'inflammation a été montré dans la survenue d'un sarcome par le MCA, faisant intervenir d'autres partenaires comme MyD88 [30], mitogen activated protein kinase 2 (MK2) [38], TNF- α [39], RAGE [40], IDO [41]. Les éléments inflammatoires peuvent cependant être reconnus et détruits par les cellules effectrices de l'immunité innée et

acquise, comme le DMBA/TPA par les lymphocytes gamma delta ou par les lymphocytes CD8⁺ [33, 42]. A l'inverse, les lymphocytes CD4⁺ semblent favoriser la progression tumorale via la production d'IL-4, IL-10 et surtout l'IL-17 mais les mécanismes exacts ne sont pas encore bien connus [42].

D'autres molécules ont été testées : ainsi, l'IL-12 protège les souris contre le DMBA/TPA et la formation de tumeurs qu'il induit. Les souris KO pour IL-12 développent plus de sarcomes [43-44]. Les souris déficitaires en IL-23 sont résistantes au développement tumoral [43-44]. Toutes ces données montrent l'importance de multiples intervenants moléculaires ou cellulaires.

La phase d'équilibre :

La phase d'équilibre ou de dormance tumorale est décrite depuis de nombreuses années [45]. Il s'agit d'un équilibre entre le système immunitaire de l'hôte et les cellules tumorales. Cette phase d'équilibre permet d'expliquer les rechutes tardives dans différentes pathologies. L'injection de MCA à faible dose chez des souris immunocompétentes entraîne le développement de tumeurs infracliniques, qui peuvent persister plusieurs mois sans être symptomatiques mais tout de même détectables [46]. Si par contre les souris sont rendues immunodéficientes par une déplétion en lymphocytes CD4⁺ et CD8⁺ ou une neutralisation de l'IFN- γ on voit rapidement apparaître un sarcome au point de ponction. La déplétion en immunité adaptative (CD4⁺ et CD8⁺) ou le blocage des cytokines qui induisent cette immunité (IFN- γ , IL-12) permet le développement tumoral. Par contre, le blocage de l'immunité innée par la déplétion en cellules NK ou l'inhibition de leur fonction (anticorps anti-TRAIL) n'entraîne pas de progression tumorale [46]. Cela permet de conclure que c'est l'immunité adaptative et non l'immunité innée qui est responsable de cette phase d'équilibre.

Il existe de nombreux modèles de dormance tumorale. Un premier modèle a été établi avec des cellules tumorales Bcl1 après une vaccination tumorale [47]. Un autre a été développé en exposant des souris déficientes en Cbl-b (Casitas B lineage Lymphoma) aux ultraviolets B pour induire des tumeurs cutanées [48]. Au sein de notre laboratoire un modèle de dormance a été mis en place à partir de cellules leucémiques murines comportant Bcr-Abl et ce, après une vaccination préalable (modèle DA1-3B), ce modèle sera décrit ultérieurement [49] (*Figure N° 18*). Les cellules dormantes sont devenues plus résistantes aux lymphocytes T CD8⁺ via une augmentation de l'expression d'une molécule de costimulation : la molécule B7-H1. Ces cellules jouent donc un rôle primordial dans cette phase d'équilibre.

La phase d'échappement :

Cette phase correspond à un échec du système immunitaire dans le contrôle et l'élimination des cellules tumorales. Le système immunitaire contribue à la progression tumorale en sélectionnant les cellules tumorales les plus agressives. L'interaction entre une population tumorale hétérogène, qui acquiert des modifications génétiques rapidement, et un système immunitaire constant, va permettre aux cellules tumorales les plus agressives de survivre. Il existe chez les cellules tumorales de nombreux mécanismes d'échappement [50-52].

L'un des premiers mécanismes est la modification des cellules tumorales. Les cellules peuvent échapper au système immunitaire. Au niveau physiologique, il existe un contrôle au sein du thymus qui permet d'éliminer les cellules T réactives afin d'assurer l'homéostasie et prévenir une auto immunité. Des modifications au niveau des cellules tumorales leur permettent la poursuite de leur prolifération et l'échappement au contrôle thymique central [53]. En plus de cette tolérance, les cellules tumorales peuvent acquérir des défauts dans leur présentation d'antigènes qui facilitent leur évasion. Par exemple la perte de molécule de classe I type beta2microglobuline, LMP2, LMP7 ou la perte de sensibilité à l'IFN- γ ou α [54-55]. Cette perte de sensibilité à l'IFN- γ peut survenir avec l'apparition de mutations ou de modifications épigénétiques de gènes codant pour le récepteur de l'IFN- γ (IFNGR1, IFNGR2, JAK1 ; JAK2 et STAT 1) [56].

L'instabilité génétique des cellules tumorales crée également des variants des antigènes qui ne sont plus détectés par les lymphocytes T CD8⁺ spécifiques. Il en est de même pour le système inné avec une insensibilisation des cellules tumorales aux cellules NK et un blocage de maturation des cellules dendritiques [57-58]. Les cellules tumorales peuvent échapper au système immunitaire en augmentant l'expression de molécules anti apoptotiques telles que FLIP et BCL-XL [59-60]. Elles peuvent aussi exprimer à leur surface des récepteurs de mort inactifs (TRAIL, Fas, DR5) [60] ou des ligands qui inhibent le système immunitaire. Par exemple l'expression de B7-H1 [61], HLA-G [62] et HLA-E [63] à la surface des cellules tumorales a un rôle inhibiteur sur les lymphocytes T.

L'échappement tumoral est aussi en lien avec de nombreuses modifications de l'environnement lui-même : les nombreuses cytokines produites par les cellules tumorales vont directement inhiber le système immunitaire inné et adaptatif. On peut citer comme molécule le VEGF [64], le TGF- β [65], ou l'IL-10 [66]. Les cellules tumorales peuvent aussi exprimer des enzymes telles que l'IDO qui métabolise le tryptophane en kynurénine. La

kynurénine va inhiber la prolifération des lymphocytes T CD8⁺ et induire l'apoptose des T CD4⁺ [67]. La production de GM-CSF, d'IL-1b, et de PGE2 par les cellules tumorales permet l'expansion des cellules myéloïdes (MDSCs) et donc l'inhibition des lymphocytes par différents mécanismes (production TGF- β , déplétion en arginine, et l'induction de T reg) [68].

Enfin, de nombreuses tumeurs utilisent le système immunitaire par l'intermédiaire des TAMs (Tumor associated macrophages) en les attirant par la production d'IL-4 et d'IL-13. Les TAMs vont alors produire du TGF- β et de l'IL-10 qui vont stimuler le développement du stroma et l'angiogénèse grâce à la production de PDGF [69], ce qui va ainsi favoriser la croissance tumorale.

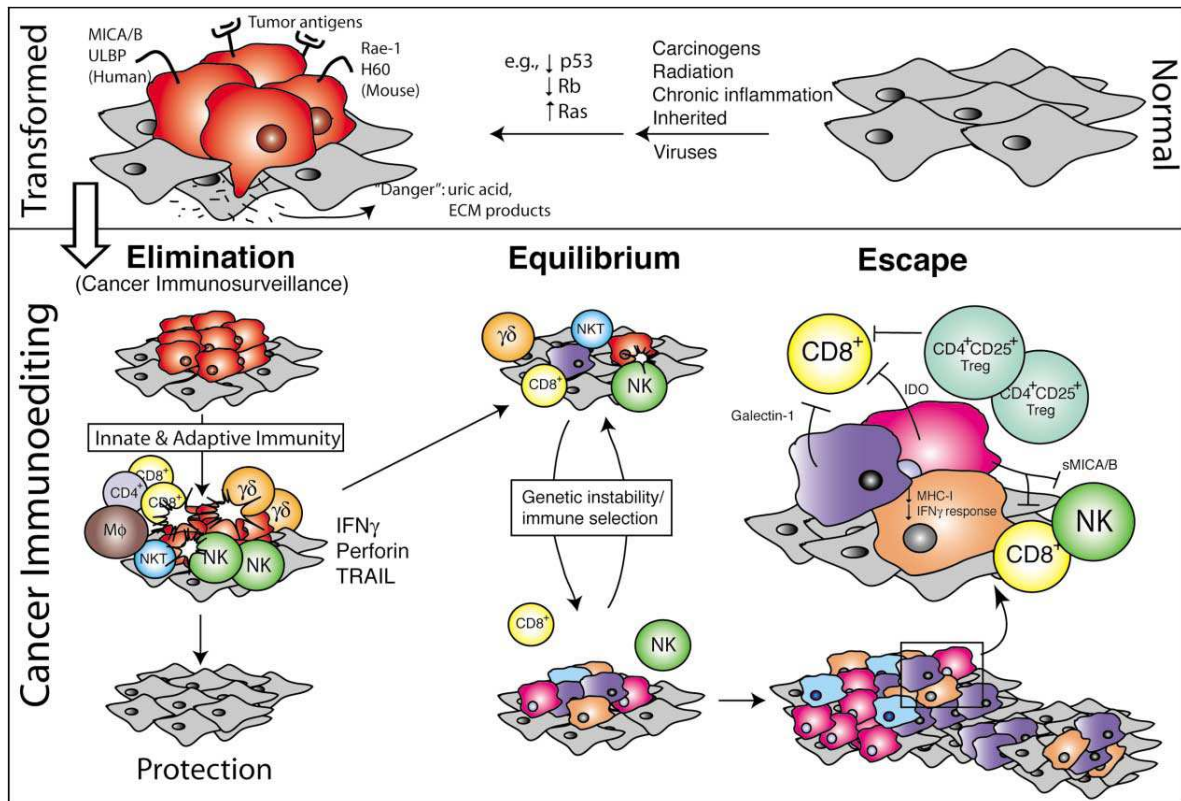


Figure 2. Les 3 phases d'immunoediting.

Les cellules normales (en gris) subissent de nombreuses stimulations par différents carcinogènes et peuvent devenir des cellules tumorales (en rouge). Dans la phase précoce de tumorigénèse, les cellules expriment des marqueurs tumoraux spécifiques qui génèrent un signal pro inflammatoire de danger qui met en route le processus d'immunoediting. Dans la phase d'élimination, les cellules du système immunitaire inné et adaptatif vont lutter contre le développement tumoral. Cependant si ce processus n'est pas complet, les cellules tumorales peuvent persister en équilibre avec les cellules normales. Ces tumeurs sont donc sculptées par le système immunitaire avec apparition de tumeurs variantes. Ces tumeurs variantes peuvent échapper au système immunitaire et devenir détectables en clinique [70].

b. L'immunoévasion dans les leucémies aigues myéloïdes

Les leucémies aigues myéloïdes sont encore des pathologies au pronostic très sombre. Au cours de ces dernières années, l'amélioration de la survie des malades a surtout résulté d'une meilleure prise en charge des complications infectieuses (bactériennes ou fongiques) et de l'amélioration du support transfusionnel. Les thérapeutiques (polychimiothérapies) ont peu évolué depuis trente ans. Seul le développement des allogreffes de cellules souches hématopoïétiques (CSH) a permis de diminuer le nombre de rechutes, au prix souvent d'une importante morbidité. La diminution des rechutes grâce aux allogreffes de CSH suggère un rôle clef du système immunitaire dans les mécanismes de rechute.

L'avancée dans la compréhension des mécanismes d'immunoévasion permettrait sans doute l'amélioration des résultats thérapeutiques. Dans les LAM, ces mécanismes sont complexes et font intervenir de nombreux éléments. Nous en verrons les principaux ci-après, et nous exposerons les différents modèles d'immunothérapie déjà réalisés dans cette pathologie.

Éléments impliqués dans l'immunoévasion des LAM :

Expression d'antigènes :

Les LAM sont des pathologies hétérogènes. De nombreux antigènes peuvent être exprimés par les cellules tumorales. On retrouve ainsi des protéines antigéniques directement liées à la leucémogénèse, comme les transcrits de fusion tels que Bcr-Abl, PML-RAR α , CBF β -MYH11, AML1-ETO...mais aussi d'autres antigènes comme RHAMM (receptor for hyaluronic acid mediated motility), MPP11, SSX2IP, PASD1... Certaines molécules, présentes sur les cellules normales, sont surexprimées à la surface des cellules tumorales, comme WT-1, protéinase 3 (PR-3), ou la survivine [71]. L'identification de ces antigènes va sans doute un jour permettre la réalisation de vaccinations anti tumorales. Les premiers essais vous seront décrits ultérieurement.

Défaut d'expression de CMH :

Il existe peu de données sur l'expression HLA de classe I et II dans les LAM. Les données disponibles sont réalisées sur de petites séries.

Pour les molécules HLA de classe I, il existerait une corrélation entre la perte de celles-ci et la leucocytose au diagnostic [72]. La perte des HLA de classe I est peu fréquente dans les LAM à l'inverse des tumeurs solides. Il n'existe pas de perte d'haplotype et lorsque qu'il y a une

perte de différents loci elle épargne la classe HLA-C [73]. La perte allélique HLA de classe I est très peu fréquente [74].

Pour la classe II, les pertes se retrouvent dans la majorité des LAM au diagnostic et à la rechute sans modifications contrairement aux tumeurs solides [75]. Il n'existe pas de corrélation avec des données cliniques de survie et de rechute. Cependant une expression forte de CLIP (Classe II associated invariant chain) semble être un facteur de mauvais pronostic. Cette anomalie n'est pas retrouvée fréquemment dans les LAM de bon pronostic. Pour les LAM à caryotype normal, une expression de plus de 35% de CLIP est corrélée à une survie sans maladie (DFS) plus courte [76]. Enfin, il a été montré qu'un haut niveau d'expression de CLIP semblait abolir l'induction de lymphocytes T CD4⁺ auto ou allogéniques [77].

Molécules de costimulation :

De nombreuses molécules de la famille B7 sont retrouvées sur les blastes de LAM. Par contre plusieurs études ont montré une faible expression de B7.1. Les résultats sont parfois contradictoires selon les membres de cette famille et selon les équipes. Comme nous le verrons ci-dessous, ces molécules participent à l'inhibition de la lyse des cellules leucémiques par les lymphocytes T. Elles permettent ainsi aux cellules tumorales de survivre à distance des traitements de chimiothérapie.

Sécrétion de cytokines :

De nombreuses cytokines interviennent dans l'évasion tumorale. Leur production est en permanence régulée grâce aux interactions entre les cellules leucémiques et l'environnement. Au sein de la synapse immunologique (interaction entre les cellules présentatrices d'antigène : CPA et les lymphocytes T) se trouve le récepteur à l'IFN- γ . La concentration d'IFN- γ au sein de cette synapse influence la stabilité de l'interaction entre les CPA et les lymphocytes T. Les blastes de LAM produisent de l'IFN- γ . L'augmentation de sa concentration dans la synapse immunologique va la rendre moins stable et donc diminuer la réponse lymphocytaire [78] (*Figure N°3*).

Enfin, les cellules blastiques produisent également du VEGF, de l'IL-6, du GM-CSF, de l'IL-10 et du TGF- β . Ces molécules interviennent dans la diminution de la maturation et de l'activation des cellules dendritiques avec une diminution de leur fonction de cellules présentatrices d'antigène [79-80].

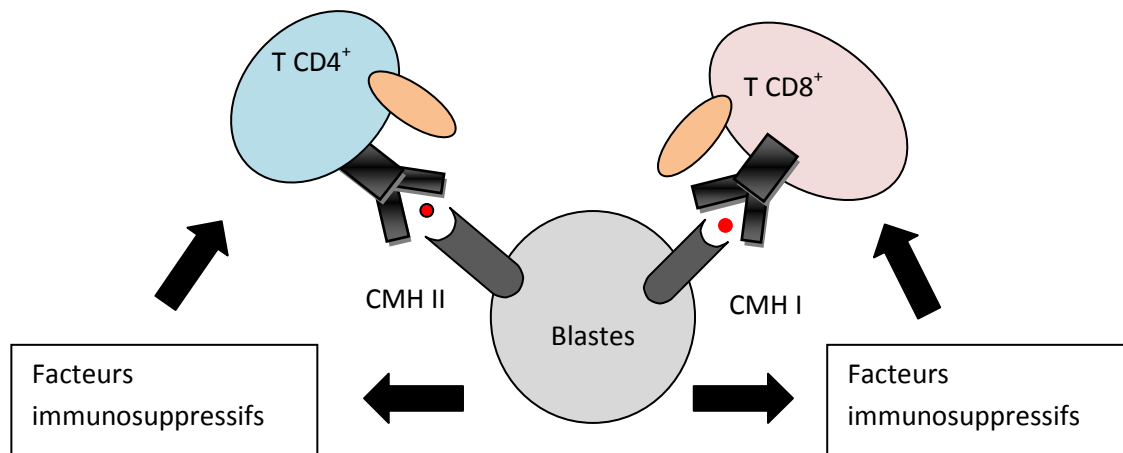


Figure N°3 : Mécanismes d'évasion tumorale des blastes de LAM. Les blastes de LAM expriment à leur surface des complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH) de type I et II. Il existe donc une interaction directe avec les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ avec une inhibition de ceux-ci. Les blastes sécrètent aussi des facteurs immunosuppresseurs tel que l'IFN- γ , IL-10, VEGF, TGF- β qui vont aussi inhiber les lymphocytes T de manière indirecte.

NK :

L'équipe de Pizzolo a montré que l'activité des NK était inversement corrélée à la progression de la maladie et au taux de rechute des LAM [81]. Les NK des patients atteints de LAM présentent une diminution de leurs récepteurs activateurs (NKP46, NKP30, DNAM-1, CD244 et CD94/NKG2C). En parallèle, les cellules leucémiques expriment à leur surface les ligands de ces différents récepteurs (DNAM-1 L, NKG2D, CD48L) [82-83]. Une hypothèse est que la stimulation en permanence des récepteurs activateurs des NK par leurs ligands respectifs situés sur les cellules leucémiques, entrainerait une régulation négative de ceux-ci [84] (*Figure N°4*).

Par ailleurs, les NK des patients présentent aussi une augmentation de l'expression des récepteurs NKG2A. Ces récepteurs sont de manière naturelle, moins cytotoxiques [85]. Les blastes peuvent être résistants aux NK grâce à la sécrétion de facteurs immunosuppresseurs ou par la perte de leur récepteur Fas ou TNF permettant l'activation des NK [86-87].

En dehors des anomalies des NK et de leur diminution d'effet cytotoxique direct sur les blastes, les NK participent aussi à l'activation d'autres cellules comme les cellules dendritiques. Normalement les NK vont tuer les cellules dendritiques immatures et les lymphocytes T pour limiter les phénomènes d'inflammation [88]. Dans les LAM, les NK inefficaces ne vont pas détruire les cellules dendritiques et vont donc entraîner une augmentation de production de lymphocytes T tolérogènes contribuant ainsi à l'échappement tumoral [89].

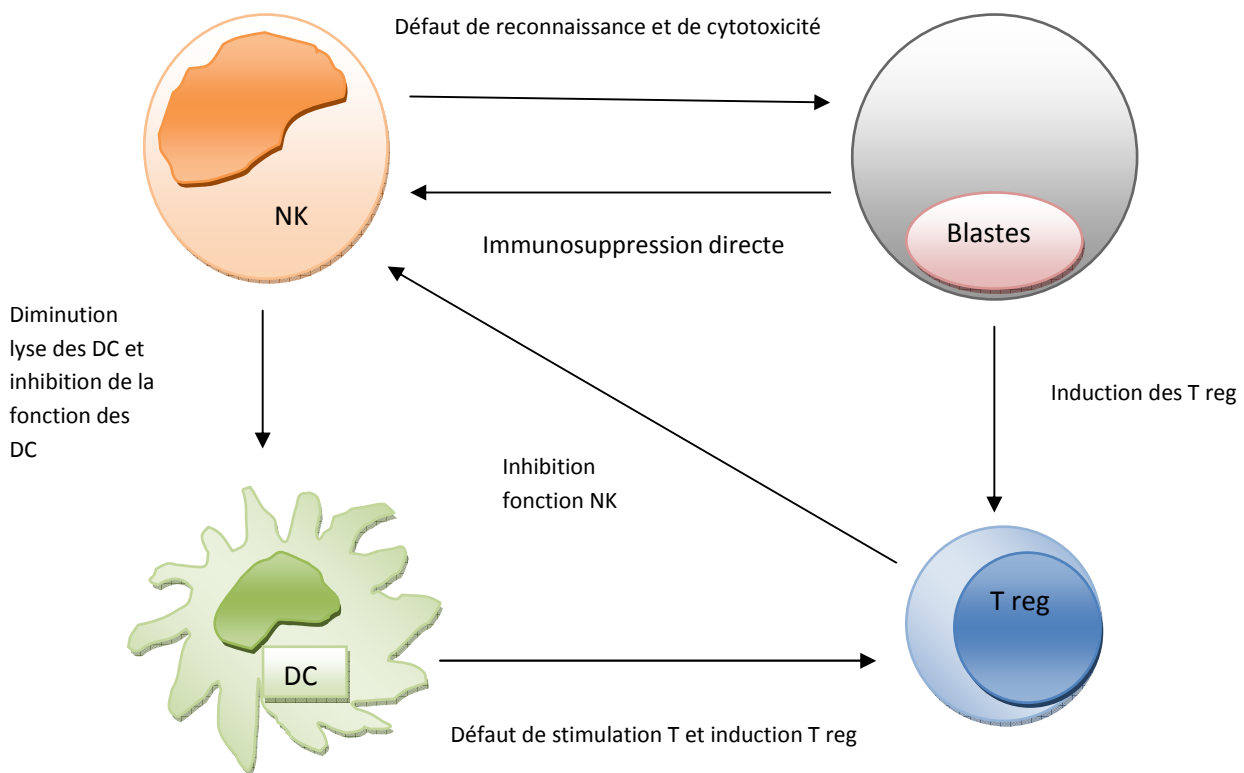


Figure N°4 : Implication des NK dans l'évasion tumorale des LAM. Il existe plusieurs mécanismes qui contribuent à l'évasion des cellules leucémiques aux NK. D'abord il existe des mécanismes directs avec des modifications au niveau des NK: diminution expression des NCR (récepteurs activateurs), augmentation expression NKG2A, diminution production IFN- γ ou des blastes : augmentation expression des ligands des NCR. Ensuite, des mécanismes indirects impliquant d'autres cellules comme les cellules dendritiques ou les T reg. Les blastes peuvent sécréter des cytokines immunosuppressives qui vont stimuler les T reg et donc inhiber de manière indirecte les NK (selon Lion [88]).

Cellules dendritiques leucémiques et T reg:

Les cellules dendritiques ont un phénotype et une fonction hétérogène in vivo et in vitro. Il existe deux formes distinctes en fonction de l'expression du CD11c : les cellules dendritiques plasmocytoïdes (PDC) et les cellules dendritiques myéloïdes (MDC) [90]. Chez les patients atteints de leucémie, ces deux types de cellules peuvent avoir des anomalies chromosomiques identiques aux blastes leucémiques, anomalies visualisées grâce au FISH et signant leur appartenance au clone.

Les PDC leucémiques ont une moins bonne maturation que les cellules normales, ce qui entraîne une diminution de sécrétion de l'IFN- α . Celui-ci ne peut donc plus exercer autant son rôle d'activateur des effecteurs cytotoxiques. Ces PDC leucémiques engendrent également une moins bonne allo stimulation, et donc entraînent une certaine tolérance des cellules tumorales par le système immunitaire [91]. Le dysfonctionnement des PDC peut dérégler la réponse anti leucémique et exercer un effet indirect immunosuppresseur.

Le rôle des cellules dendritiques myéloïdes est moins clair. Elles pourraient induire une régulation des lymphocytes T in vitro et in vivo [92-93]. Elles entraîneraient l'induction de T reg [92-93]. Il existe en effet une dérégulation au niveau des T reg en cas de LAM. Leur nombre est plus important chez les patients atteints de LAM par rapport à des donneurs sains [94]. Par contre, les T reg sont en petit nombre chez les patients en rémission complète avec une augmentation de ceux-ci au moment de la rechute [95].

Modèles d'immunothérapie dans les LAM :

L'immunothérapie dans les LAM reste encore bien compliquée de part l'hétérogénéité des LAM, les différences de résultats obtenus in vitro par rapport à l'in vivo, les proliférations T très variables selon les patients et les problèmes de ratio entre cellules T et cellules leucémiques. Plusieurs essais d'immunothérapie ont eu lieu dans les LAM (*Tableau N°1*).

Greffes allogéniques

Le premier modèle d'immunothérapie est l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques, réservée à un faible nombre de patients compte tenu d'une toxicité non négligeable. Cette toxicité est liée aux décès précoces induits par le conditionnement mais aussi aux complications immunologiques comme la GVHD (graft versus host disease). De manière intéressante, les patients qui font de la GVHD présentent moins de rechute, ce qui suggère un lien entre la GVHD et l'effet GVL (Graft versus leukemia) [96]. Les greffes réalisées avec des greffons T déplétés ou avec des doses d'immunosuppresseurs plus importantes sont également plus à risque de rechute [97-98]. La réinjection de lymphocytes du donneur permet l'obtention d'une nouvelle rémission dans les LAM dans 10 à 30% des cas [99-100]. Aujourd'hui, il est possible de réaliser des réinjections de lymphocytes lorsque la maladie résiduelle est à nouveau détectable chez le patient. Ceci est surtout valable dans le cadre des leucémies myéloïdes chroniques (BCR-ABL). Il existe des modèles animaux qui démontrent l'intérêt d'adjoindre de l'IL-2 avec les lymphocytes afin d'augmenter l'effet GVL, mais ceci n'a pas montré son efficacité chez l'homme dans les LAM [101-102].

Immunothérapie avec cellules dendritiques (DC)

Les DC jouent un rôle important dans la réponse immunologique. Elles capturent l'antigène et le préparent afin de le présenter aux lymphocytes T naïfs via le CMH. Différents éléments extérieurs (agents microbiens, stimulation inflammatoire) peuvent modifier le phénotype et la fonction des DC. Les DC matures peuvent ensuite migrer vers les aires lymphatiques.

Les cellules dendritiques sont donc de bonnes candidates pour mettre en place une vaccination anti tumorale et générer une réponse T autologue efficace permettant alors de diminuer le nombre de rechutes. La production de DC in vitro est possible grâce à l'utilisation de cellules CD34⁺ ou CD14⁺. La culture de ces cellules avec du GM-CSF et de l'IL-4 permet, en 5 à 7

jours, l'obtention de DC immatures [103-104]. La maturation se fait ensuite grâce à la culture en présence de différentes cytokines dont la liste reste encore controversée (IFN- γ , TNF- α , LPS, CD40L).

Différentes équipes ont pu démontrer la possibilité d'obtenir in vitro des DC à partir de cellules leucémiques grâce aux mêmes combinaisons cytokiniques [105-107]. Leur maturation est également possible (TNF- α , IL1b, IL-6 et CD40L) et ces cellules conservent des propriétés de migration dans le système lymphatique [108-109]. Toujours in vitro, ces DC leucémiques sont capables de stimuler les lymphocytes T, d'entraîner une réponse Th1 en stimulant les CD8⁺ et de lyser les blastes autologues [106-108, 110]. La réinjection de ces DC leucémiques à l'homme se fait après une irradiation afin d'éliminer le risque de prolifération. Cette irradiation ne modifie pas les capacités de migration [111].

L'obtention des DC leucémiques est effective seulement chez 60 -70% des LAM à partir des cellules blastiques du diagnostic. Il est possible par contre d'utiliser aussi, après rémission complète, les monocytes du patient pour produire des DC. L'obtention de ces cellules n'est pas fonction du type Fab de la LAM. Par ailleurs il existe de bons facteurs prédictifs d'expansion comme l'expression du CD14 sur les blastes, l'expression du récepteur au TNF- α et du CD86 [112-114]. La présence d'une duplication en tandem de FLT3 sur les blastes est un facteur de mauvaise différenciation [115].

Il existe différentes stratégies vaccinales soit une vaccination peptidique en utilisant les antigènes associés au LAM, soit une élution peptidique, soit des cellules apoptotiques, soit des lysats de cellules nécrotiques ou directement en utilisant l'ADN des cellules leucémiques [116-119].

Il est aussi possible de moduler l'interaction entre les DC et les lymphocytes grâce à l'utilisation d'adjuvants ou de molécules de costimulation. Au sein du laboratoire, une vaccination a été réalisée en utilisant une lignée de cellules murines leucémiques avec adjonction de l'IL-12 ou de GM-CSF [49, 120]. D'autres adjuvants ont été utilisés comme le CD40L, IL-12 ou les ligands des TLR 7 et 9 [121-122]. Il existe différents modèles murins in vivo utilisant différentes molécules de costimulation comme B7-H1, PD-1 et blocage CTLA-4 [123-125] (*Tableau N°1*).

Ces modèles murins ont permis ensuite de réaliser plusieurs essais de vaccination avec les cellules dendritiques chez l'homme. Ces essais ont eu lieu, au début, chez des patients atteints

de LMC. Le premier essai a été réalisé par Fujii en 1999 chez un seul patient, puis Ossenkoppele en 2003 chez trois patients [118, 126]. Les premiers essais dans les LAM ont débuté dans les années 2000, l'équipe de Houtenbos a pu obtenir pour 9 patients des DC (15 patients inclus initialement) à partir des cellules leucémiques du diagnostic. Malheureusement la majorité des patients n'ont pas obtenu de rémission complète ou ont rechuté avant la vaccination. Les patients vaccinés n'ont pas eu de toxicité, ni de réponse [127]. L'équipe de Li en 2006 a réalisé une vaccination peptidique avec un antigène tumoral : PRAME chez 5 patients. Ils ont mis en évidence une augmentation du nombre de lymphocytes T et une augmentation de la réponse Th1 sans effet secondaire chez ces patients [128]. Un essai de phase I/II a été réalisé par Roddie en 2006 chez 21 patients (14 LAM au diagnostic, 6 rechutes et 2 SMD), il a été retrouvé une augmentation des lymphocytes T chez seulement 4 patients.

La vaccination avec des cellules dendritiques se heurte à plusieurs problèmes : tout d'abord la possibilité d'obtention des DC, le nombre de cellules limité et les rechutes fréquentes. Une autre approche a consisté à l'utilisation de DC allogéniques. Les résultats sont controversés. La source principale des cellules est l'utilisation d'une lignée humaine dérivant des cellules CD34+ : MUTZ-3.

L'immunothérapie avec les DC va nécessiter une standardisation tout d'abord, des définitions morphologiques et phénotypiques des DC, un meilleur choix des cytokines pour obtenir la maturation, une standardisation des protocoles cliniques et la définition du meilleur moment pour la vaccination.

Expériences in vitro	
Stimulation lymphocytes par cellules dendritiques pulsés par :	
Blastes lysés	[117]
Blastes irradiés	[118]
Blastes apoptotiques	[129]
ARN Survivin	[116]
Peptide MUC1	[119]
Cellules dendritiques dérivées des blastes	[105, 108]
In vivo chez l'animal	
Vaccination dans modèle murin :	
Blastes irradiés et transduits B7.1 par rétrovirus	[123]
Blastes irradiés et transduits IL-12 par rétrovirus	[120, 124]
Blastes irradiés et transduits B7-2 ou IL-4 ou TNF α ou GM-CSF par rétrovirus	[49, 125]
Blastes irradiés et transduits ligands des TLR 7 ou 9	[121-122]
In vivo chez l'homme	
Cellules dendritiques issus des blastes	[127]
Peptide dérivé de PRAME	[128]
PR-1 combiné au GM-CSF	[130]

Tableau N°1 : Essais d'immunothérapie in vitro et in vivo dans les LAM

Transfert lymphocytes T cytotoxiques

Il est possible d'identifier chez des patients en rémission complète les lymphocytes T cytotoxiques dirigés contre les cellules leucémiques mais malheureusement leur expansion in vitro est très difficile [131]. Il existe, par contre, des modèles murins qui montrent que l'administration de CTL augmente la survie des souris [132-133].

Vaccination peptidique

Des essais de vaccinations peptidiques sont en cours. L'équipe de Helsop a fait un essai de phase I/II chez 15 patients présentant une LAM ou une LMC. Cet essai utilisait un peptide : PR1. Ce peptide dérive d'une protéinase qui est présente dans les granulations primaires myéloïdes. Il peut induire des CTL capables de détruire les blastes. L'essai a consisté à l'administration de PR1 et de GM-CSF chez 15 patients. Ils ont observé 5 réponses cliniques, 2 rémissions durables et 8 productions de CTL spécifiques [130].

Vaccination « Naked » DNA

Il existe un modèle élégant de vaccination chez la souris avec l'ADN du transcrite de fusion PML-RAR α retrouvé dans les LAM3 [134]. Ce modèle a été construit en association avec le fragment C de la toxine tétanique. Les souris vaccinées survivent plus longtemps, il existe une production d'anticorps et d'IFN- α plus importante et le nombre de lymphocytes T CD8+ et CD4+ est augmenté. La réponse augmente si les souris en parallèle de la vaccination, ont reçu un traitement par ATRA. Il est aussi possible de détecter des anticorps anti PML-RAR α chez les souris simplement traitées par ATRA. Cela suggère que l'ATRA augmente la réponse Th2.

Dans ce travail, nous allons nous intéresser plus particulièrement à un des mécanismes d'immunoévasion dans les LAM impliquant la molécule B7-H1 qui appartient à la famille B7 puis à l'implication de différents métabolites de la kynurénine dans les cytopénies des syndromes myélodysplasiques.

II. La Famille B7

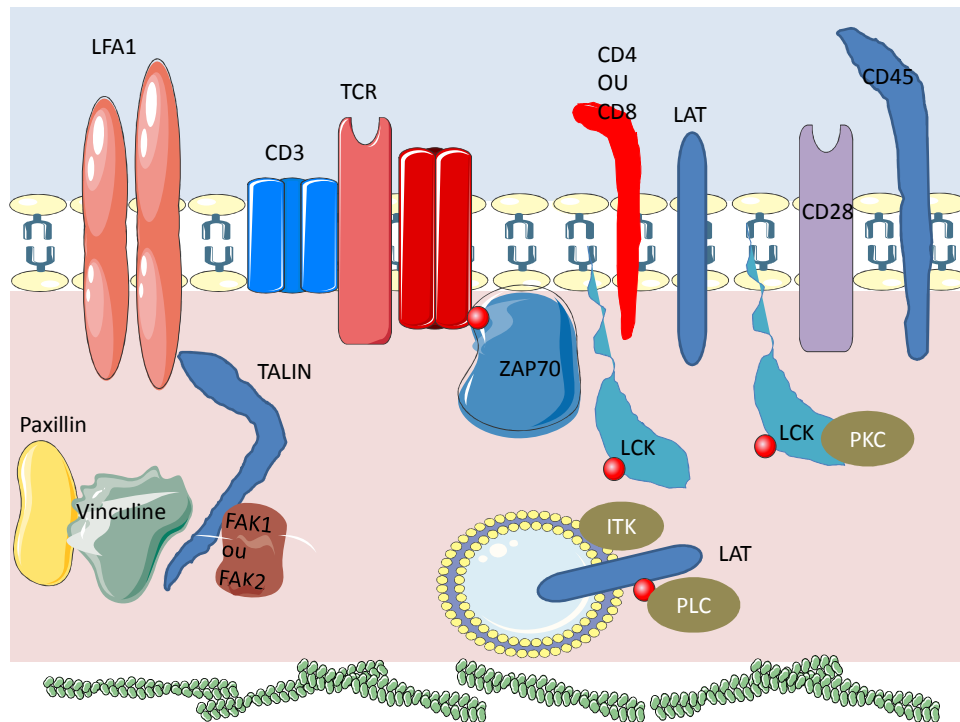
a. Généralités

Le système immunitaire est régulé de façon stricte par des signaux positifs et négatifs. Cette régulation fait intervenir de nombreuses molécules qui interviennent dans la synapse immunologique. La première synapse, à avoir été décrite, est celle entre les lymphocytes T et les cellules présentatrices d'antigènes. Elle est également retrouvée sur d'autres cellules de l'immunité innée ou acquise. Chaque synapse fait intervenir des partenaires moléculaires différents. Nous allons nous intéresser plus particulièrement à la synapse qui permet l'interaction entre les lymphocytes T et les cellules présentatrices d'antigènes.

Au sein de cette synapse, il existe une accumulation de molécules dont l'agencement est très précis. Au centre, se retrouve le récepteur de l'antigène (TCR) qui va se lier au CMH de type I ou II. Autour du TCR, on observe une région riche en protéines d'adhérence LFA-1 (leucocyte function antigen 1) qui vont se lier au récepteur ICAM1. En périphérie interviennent ensuite, les molécules de costimulation : CD2, CD28, CD4 et CD8 associées à d'autres molécules comme la taline ou l'eitrine qui interagissent avec le cytosquelette d'actine et des molécules de la signalisation comme l'adaptateur LAT (Linker of activation of T cell), les protéines tyrosine kinases Fyn, Lck (lymphocyte specific protein tyrosine kinase) et Zap70. Dans la synapse immunologique on peut ainsi définir deux zones distinctes : une zone centrale ou c-SMAC (central supramolecular activation cluster) et une zone périphérique appelée p-SMAC (peripheral supramolecular activation cluster) (*Figure N°5*).

Les molécules de la famille B7 ont donc un rôle primordial dans la régulation de l'activation et de l'inhibition du signal immunologique. Les molécules costimulatrices telles qu'ICOSL, CD80 et CD86 via leur récepteur ICOS ou CD28 entraînent l'activation et l'amplification de la réponse effectrice et les molécules co-inhibitrices diminuent ou empêchent l'activation et la différenciation cellulaire (*Figure N°6*).

A



B

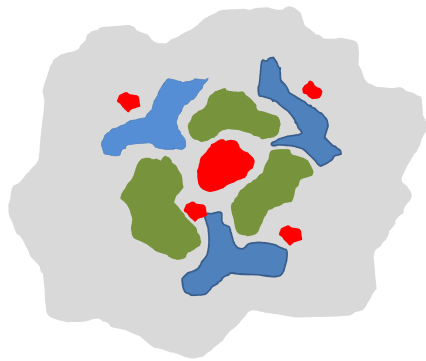


Figure N°5 : La synapse immunologique. Elle est composée de nombreuses protéines. Au centre en rouge se retrouve le récepteur de l'antigène (TCR). Ensuite autour (en vert et bleu) intervention de nombreuses protéines d'adhérence dont la protéine LFA-1 (leucocyte function antigen). Cette région comporte aussi de nombreuses molécules de costimulation (CD2, CD4, CD8, CD28) et d'autres molécules comme la Taline, LAT (Linker of activation of T cell), Fyn, Zap70 ou LCK (Lymphocyte specific protein tyrosine kinase).

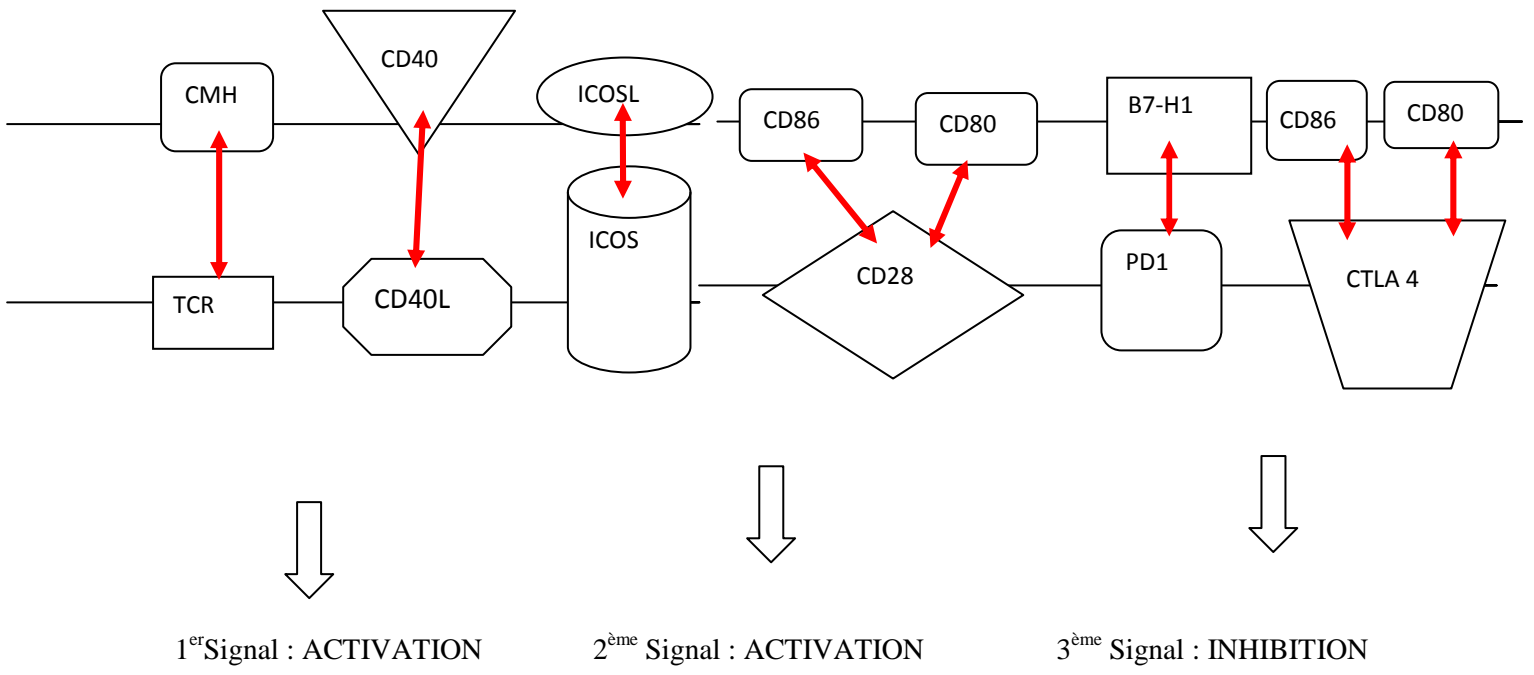


Figure N°6 : Activation des lymphocytes T. La première étape d'activation des lymphocytes T passe par la reconnaissance du complexe majeur d'histocompatibilité par le TCR (T cell receptor) puis ensuite différentes molécules de costimulation participent au cycle d'activation et inhibition du lymphocyte T.

b. Structure

Les molécules de la famille B7 sont transmembranaires. Elles comportent un domaine extra membranaire, une partie transmembranaire et une partie intracellulaire. Le domaine extra membranaire est composé d'un domaine constant (IgC) et un domaine variable (IgV) des immunoglobulines [135-137]. Ces deux domaines IgV et IgC sont codés par un seul exon, les autres exons codant pour la partie transmembranaire et intra cellulaire de la protéine. La partie cytoplasmique est courte et peut être codée par plusieurs exons. Cette partie contient des résidus sérine thréonine qui peuvent être phosphorylés.

Les deux premières molécules de la famille B7 qui ont été décrites sont B7.1 (CD80) et B7-2 (CD86) qui se lient à deux récepteurs : le CD28 et le CTLA-4. Ces molécules interviennent dans la stimulation et l'inhibition des lymphocytes T (*Figure N°4*) [138], mais également dans les mécanismes de tolérance et de la régulation de l'activation des lymphocytes T [139]. Elles interviennent comme deuxième ou troisième signal après la reconnaissance de l'antigène par les TCR (*Figure N°6*).

Ensuite de nombreux récepteurs et ligands ont été identifiés avec une homologie pour B7. On a ainsi identifié B7-H1 (CD274 ou PD-L1), B7-H2 (CD275 ou ICOS-L), B7-H3 (CD276), B7-H4 (B7S1 ou B7x), B7-H6, B7-DC (CD273 ou PD-L) et BTLN2 (*Figure N°7*). Les gènes codant pour ces différentes protéines sont localisés sur différents chromosomes: B7.1 et B7.2 sur le chromosome 3 , PD-L1 et PD-L2 sur le chromosome 9, B7-H3 sur le chromosome 15, B7-H4 sur le chromosome 1 et ICOS-L sur le chromosome 21 [140].

Les membres de la famille B7 forment des homodimères à la surface de la cellule sauf B7.2 qui est un monomère [141]. Les couples récepteur/ligand ont des affinités variables. Il existe des affinités différentes entre les ligands et les récepteurs, par exemple B7.1 a une affinité plus élevée pour CTLA-4 que B7-2 et c'est exactement l'inverse pour la liaison au CD28 [142]. PD-L2 a une affinité 6 fois plus forte pour PD-1 que pour PD-L1 [143] (*Figure N°7*).

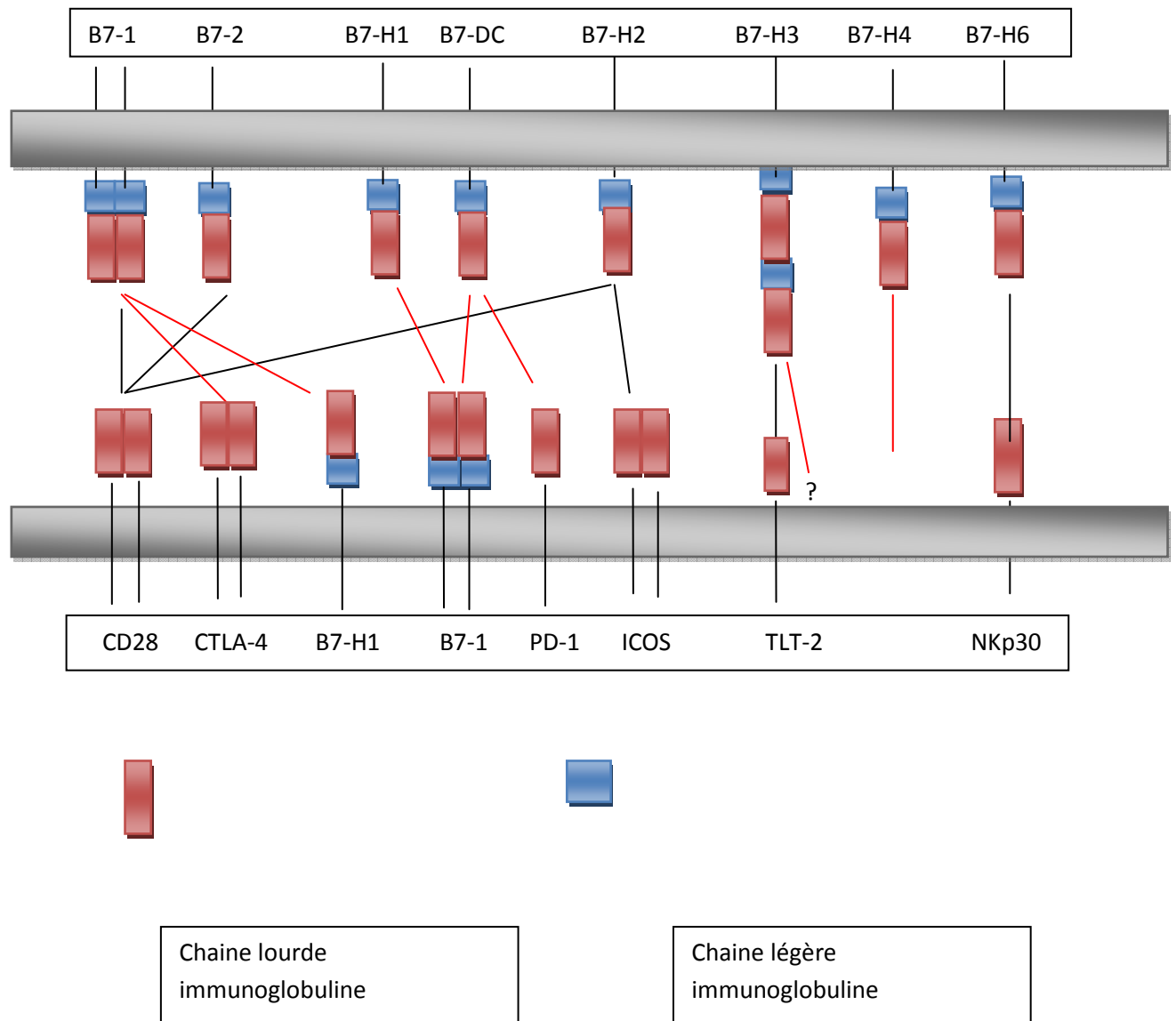


Figure N°7 : Les différents membres de la famille B7 avec leur(s) récepteur(s) respectif(s)

c. Description des membres de cette famille

Les membres de la famille B7 sont classés en 3 groupes selon leurs fonctions.

Le premier groupe comporte : B7.1, B7-2 et B7-H2.

B7.1 et B7-2 ont une expression restreinte et inductible sur les cellules présentatrices d'antigènes comme les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules hématopoïétiques. Leur expression est régulée au niveau des cellules T activées. Ces deux molécules se lient toutes les deux aux deux récepteurs : CD28 et CTLA-4. La liaison de B7.1 ou de B7-2 sur le récepteur CD28 entraîne l'activation des lymphocytes T naïfs et cette réponse est sévèrement inhibée chez les souris KO CD28 [144-145]. L'interaction de ces deux ligands avec CTLA-4 permet une régulation négative de l'activation des cellules T via CD28 et la perte de CTLA-4 entraîne une lymphoprolifération sévère et fatale [135, 146].

B7-H2 est exprimé sur les cellules B, les macrophages et les tissus non lymphoïdes. Il interagit avec un autre récepteur de la famille CD28 : ICOS (inducible costimulator) [147]. Les souris déficientes en B7-H2 ou ICOS ont un déficit pour l'activation, la différenciation en effecteurs et effecteurs fonctionnels des lymphocytes T CD4+ [148].

Le deuxième groupe comporte : B7-H1 et B7-DC

Ces deux ligands se lient au récepteur PD-1 mais il existe aussi un autre récepteur pour B7-H1 encore non identifié.[149-150] comme nous le verrons plus tard, dans le paragraphe B7-H1.

B7-DC est exprimé par les cellules B péritonéales et peut être induit au niveau des cellules dendritiques, des macrophages et des mastocytes dérivant de la moelle. Le récepteur PD-1 de ces deux ligands est exprimé sur les cellules T, les cellules B, les cellules dendritiques, les NKT et les monocytes activés [151]. L'interaction de ces deux ligands avec PD-1 module la réponse immunitaire induite par les TCR ou BCR de part son induction mais aussi son maintien. La molécule B7-H1 va secondairement stopper l'activation des lymphocytes T. Le rôle majeur de ce deuxième groupe est le maintien de la tolérance immunologique. Les souris KO pour PD-1 développent progressivement des pathologies auto immunes ce qui n'est pas observé pour les souris KO B7-H1 ou B7-DC [152].

Le troisième groupe comporte : B7-H3 et B7-H4

Pour ces deux molécules, le récepteur n'est pas encore identifié. B7-H3 est retrouvé dans de nombreux tissus. Son expression au niveau des cellules dendritiques est modulée par du LPS [153]. B7-H4 n'est exprimé que par les cellules rénales, pulmonaires et pancréatiques. Les fonctions de B7-H3 et B7-H4 restent encore bien controversées.

d. Fonctions

Les molécules costimulatrices de la famille B7 vont stimuler la prolifération des lymphocytes T, augmenter la production de cytokines et prévenir l'apoptose en stimulant la réponse T. Les molécules coinhibitrices vont engendrer un signal négatif pour limiter, terminer et atténuer la réponse T en prévenant l'hyper activation des cellules T qui pourrait entraîner des dommages tissulaires et des organes [154]. L'expression de ces molécules de costimulation sur les cellules présentatrices d'antigènes, les cellules tumorales et les cellules de l'environnement est la base de l'interaction dynamique entre le système immunitaire de l'hôte et la tumeur (*Tableau N°2*).

Les molécules de la famille B7 sont exprimées sur de nombreuses cellules tumorales mais aussi au niveau du microenvironnement tumoral [155].

Expression de la famille B7 et de leur récepteur sur les tumeurs

Les membres de la famille B7 sont retrouvés sur de nombreuses hémopathies ou tumeurs solides (*Tableau N°3*). B7-H1 est exprimé par les tumeurs solides : cancer du sein, colon, œsophage, estomac, foie, rein, ovarien, pancréatique, glioblastome, mélanome mais aussi par les hémopathies : myélomes multiples, leucémies aiguës [61, 156-158]. Par contre, B7-DC n'est retrouvé que dans des lymphomes non hodgkinien de type manteau et dans les cancers pulmonaires non à petites cellules [159-160]. B7-H4 est retrouvé sur de nombreuses tumeurs : sein, poumon, rein, prostate, endomètre, cerveau [161]. Beaucoup de tumeurs peuvent exprimer à la fois B7-H1 et B7-H4. Cependant, pour certaines, la co-expression de ces deux molécules est impossible comme dans les mélanomes où on retrouve exclusivement la molécule B7-H1. Dans l'immédiat, les données sur B7-H2 et B7-H3 sont limitées et contradictoires. Des résultats récents de l'équipe de Qiu retrouvent une expression de B7-H3 sur les blastes de leucémie aigue dans 44.8%. Il montre une corrélation entre les caryotypes de

mauvais pronostic et l'expression de B7-H3. Il existe la même corrélation avec l'expression de CD34+. Les patients dont les blastes expriment B7-H3 ont une survie sans rechute et une survie globale plus courte [162].

Expression de la famille B7 sur les cellules immunitaires de l'hôte

B7-H1 est exprimé au niveau des lymphocytes T infiltrant la tumeur, au niveau des macrophages, des fibroblastes et au niveau des cellules dendritiques myéloïdes [163]. L'expression de B7-DC est limitée aux macrophages et aux cellules dendritiques [164]. B7-H3 et B7-H4 sont fortement exprimés par les cellules vasculaires endothéliales du micro environnement tumoral. B7-H4 est retrouvé sur des macrophages du tissu tumoral des cancers ovariens mais il n'est pas retrouvé dans le tissu sain.[165-166].

Régulation de l'expression de la famille B7 sur le microenvironnement tumoral

Les ARNm de B7-H1 et B7-H4 sont présents dans de nombreux tissus, ce qui contraste avec l'expression de la protéine qui ne se retrouve pas dans l'ensemble des tissus. Cela implique donc une régulation post transductionnelle importante dont les mécanismes aujourd'hui ne sont pas encore élucidés. Des médiateurs de l'inflammation comme l'IFN- γ , IL4, TNF- α et VEGF permettent l'expression de B7-H1 dans de nombreux tissus et notamment les cellules tumorales. La stimulation par l'IFN- γ permet l'expression de B7-H1 au niveau des lymphocytes T, des cellules NK, des macrophages, des cellules B, des cellules dendritiques et des cellules endothéliales vasculaires ce qui va inhiber les lymphocytes T activés [167]. En plus de l'IFN- γ , l'IFN de type I stimule aussi l'expression de B7-H1 sur les monocytes, les hépatocytes, les cellules dendritiques et les cellules tumorales. Par contre, l'expression de B7-H2 est régulée par la présence de GM-CSF et IL-4 [168]. L'expression de B7-H4 est augmentée par l'IL-6 et l'IL-10 et à l'inverse diminuée par le GM-CSF et l'IL-4 [169]. L'expression des 2 molécules coinhibitrices (B7-H1 et B7-H4) n'est donc pas régulée par les mêmes cytokines.

Implication pronostic de la famille B7 dans les tumeurs

L'expression de B7-H1, B7-H3 et B7-H4 au niveau des cellules tumorales est un facteur pronostic péjoratif. Dans les cancers du sein, l'expression de B7-H1 est corrélée avec des tumeurs de haut grade à forte prolifération et ayant moins de récepteurs hormonaux [157]. Les taux de survie sont inférieurs chez les patients qui présentent un cancer de l'œsophage ou gastrique ou pancréatique exprimant B7-H1, et les tumeurs sont plus invasives [170-171].

L'expression de PD-1 a aussi une valeur pronostique péjorative dans les cancers urothéliaux [172] (*Tableau N°3*).

Nous allons nous intéresser maintenant plus particulièrement à la molécule B7-H1 dans les hémopathies malignes.

Groupe	Ligands de la famille B7		Récepteurs de la famille CD28		
	NOM	EXPRESSION	NOM	EXPRESSION	FONCTION
I	B7.1 (CD80)	CPA activées	CD-28	Cellules T	Stimulation
			CTLA-4	Cellules T activées	Inhibition
	B7-2 (CD86)	CPA activées	CD28	Cellules T	Stimulation
			CTLA-4	Cellules T activées	Inhibition
	B7-H2 (L-ICOS)	Cellules B, macrophages, tissus non lymphoïdes	ICOS	Cellules T activées	Stimulation
II	B7-H1 (PD-L1)	CPA, tissus non lymphoïdes, tumeurs	PD-1	Cellules T activées, B et myéloïdes	Inhibition
		NK	B7.1		
	B7-DC (PD-L2)	CPA, tissus non lymphoïdes	PD-1	Cellules T activées, B et myéloïdes	Inhibition Activation
III	B7-H3	CPA, tissus lymphoïdes et non lymphoïdes, tumeurs	Pas identifié	Cellules T activées	Inhibition Activation ?
	B7-H4	Tissus épithéliaux, tumeurs	Pas identifié	Cellules T activées	Inhibition

Tableau N°2 : Expression des différents membres de la famille B7 avec leurs récepteurs et leurs fonctions.

Molécule	Fréquence (%)	Association clinique	Référence
B7-H1			
Cancer vessie	100	Haut risque de rechute et taux de survie faible	[173]
Cancer du sein	60	Ki67 élevé, haut grade	[157]
Cancer pulmonaire(NPC)	100	Non associé aux métastases	[159]
Cancer pancréatique	38.2	Stade avancé	[158]
B7-H2			
Cancer pulmonaire (NPC)	100	Aucune	[159]
Cancer ovaire	37.1	Aucune	[174]
Cancer pancréas	27.5	Aucune	[175]
B7-H3			
Cancer gastrique	85.8	Tumeur infiltrante	[171]
Cancer pulmonaire (NPC)	37	Association avec métastases	[176]
Cancer prostate	93	Association avec métastases	[177]
B7-H4			
Cancer sein	95.4	Carcinomes invasifs	[178]
Cancer du poumon (NPC)	43	Réduction des lymphocytes infiltrant tumeur	[176]
Cancer pancréatique	27.5	Survie courte	[179]
Cancer prostate	99	Métastase, pauvre survie	[177]
NPC : non à petites cellules			

Tableau N°3 : Expression des différents membres de B7-H dans le cadre de tumeurs solides.

III. La molécule B7-H1

a. Structure et expression

La molécule B7-H1 (PD-L1, Programmed Death 1 Ligand ou CD 274) est une protéine transmembranaire de type I, elle comporte 290 acides aminés. Elle est codée par le gène Cd274, qui se trouve sur le chromosome 19 chez la souris et sur le chromosome 9 chez l'homme (*Figure N°8*).

Le gène Cd274 comporte 7 exons. Le premier exon est non codant, il contient la partie 5'UTR. Les trois exons suivants codent pour le domaine IgV-like et IgC-like. Les exons 5 et 6 contiennent respectivement le domaine transmembranaire et le domaine intra cellulaire. Le dernier exon contient la fin de la partie intra cellulaire et la partie 3'UTR. Le domaine intra cellulaire est court, il comporte seulement 30 acides aminés (*Figure N°9*).

Chez l'homme il existe un seul variant décrit qui ne se lie pas au récepteur PD-1. Sa fonction reste encore non définie [180]. Le domaine extracellulaire de B7-H1 comporte 20% d'homologie avec celui de B7.1 et 15% d'homologie avec celui de B7-2. Le domaine transmembranaire est identique pour toutes les molécules. Il comporte 4 cystéines qui forment des ponts disulfures entre la portion « immunoglobulin like V » et la portion « immunoglobulin like C domains ». Le domaine cytoplasmique est identique pour les différents membres de cette famille [138].

B7-H1 est exprimé sur les lymphocytes B, T, les macrophages, les cellules mésenchymateuses et les cellules dendritiques [168]. A la différence des autres membres de cette famille, B7-H1 est aussi présent à la surface des cellules non hématopoïétiques comme les cellules endothéliales, cardiaques, pulmonaires, pancréatiques, musculaires et placentaires.

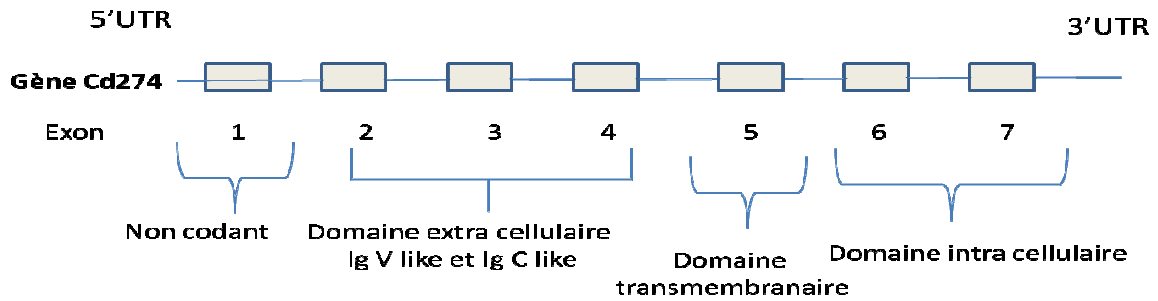


Figure N°8 : Gène CD274

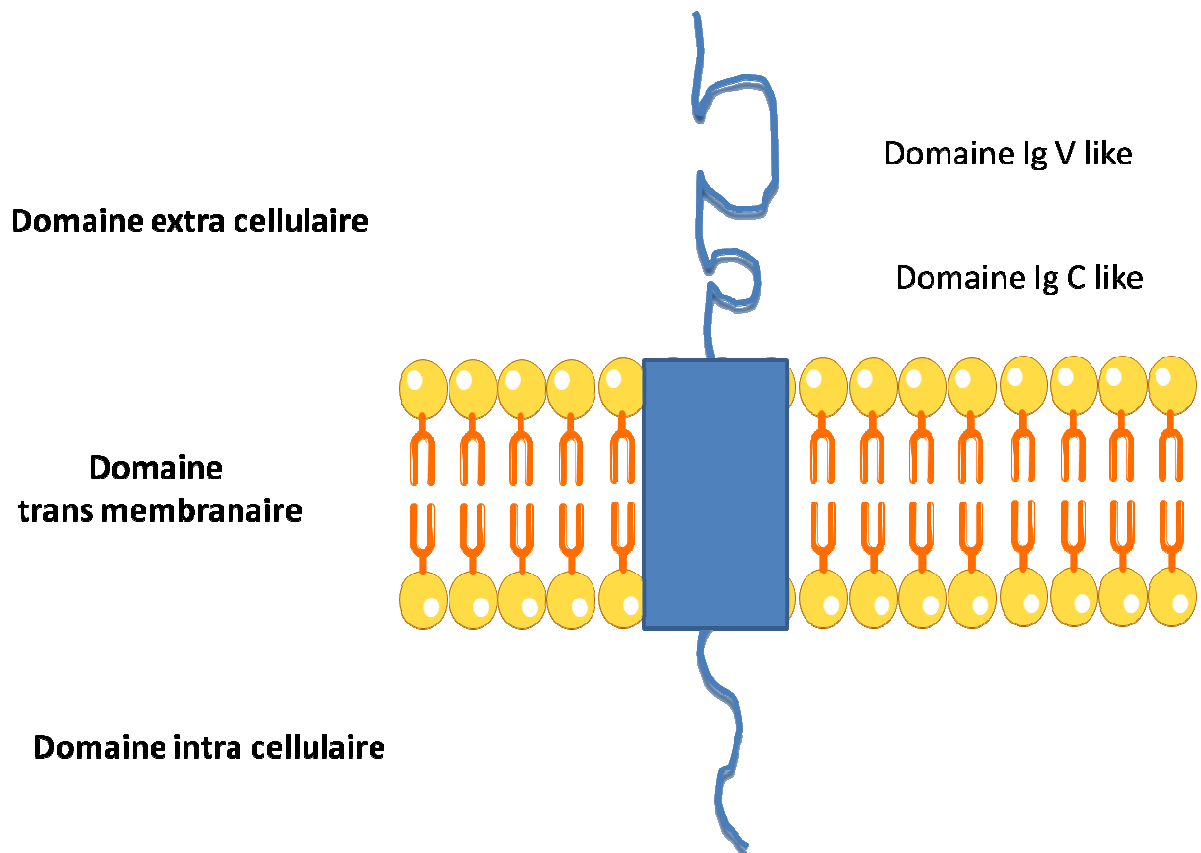


Figure N°9 : Structure de la molécule B7-H1.

L'expression de B7-H1 à la surface des cellules peut être augmentée par les IFNs de type I et II, le TNF- α et le GM-CSF [61, 163, 181-183]. Les ligands des Toll like receptor (TLR) peuvent aussi moduler l'expression de B7-H1.

Les TLR reconnaissent et répondent à de très nombreux ligands endogènes ou exogènes (PAMP : pathogen associated microbia pattern) (*Figure N°10*). Il existe à ce jour 10 TLR identifiés chez l'homme. La liaison des ligands à leurs récepteurs entraîne l'activation de nombreuses voies de signalisation passant plus ou moins par la protéine adaptatrice MyD88 (*Figure N°11*). L'activation de ces différentes voies va engendrer la production de nombreuses cytokines pro inflammatoires qui vont réguler l'activation des cellules du système immunitaire inné et adaptatif (*Figure N°12*). Le système inflammatoire semble donc être impliqué dans la tumorigénèse.

De nombreuses études ont mis en évidence la présence de différents TLR dans les tumeurs solides : sein, mélanome, poumon, colon, rein. Il existe en ce moment des essais cliniques utilisant différents ligands des TLR dans les tumeurs solides. Au niveau hématologique, ces TLR ont surtout été retrouvés dans les pathologies lymphoïdes B [184-189]. Notre équipe a mis en évidence la présence de TLR 2, 4 et 9 au niveau des plasmocytes dans le myélome multiple [190]. Il a été récemment mis en évidence que l'activation de TLR4 au niveau de cellules de Langerhans induit l'expression de B7-H1 et augmente les phénomènes de tolérance au niveau de la bouche [191-192]. Il existe à ce jour peu de données sur TLR et LAM. Il est possible d'obtenir des cellules dendritiques à partir de blastes après stimulation par différents agents dont le LPS (ligand du TLR 4), cela suggère donc que les blastes reconnaissent le LPS in vitro [193-194]. Le LPS n'est pas suffisant pour obtenir la maturation et il peut passer par d'autres voies que les TLR. L'équipe de Marcucci, dans les LAM à caryotype normal, a mis en évidence que l'expression des TLR est inversement corrélée au niveau de micro RNA-181. Cette corrélation est de mauvais pronostic [195].

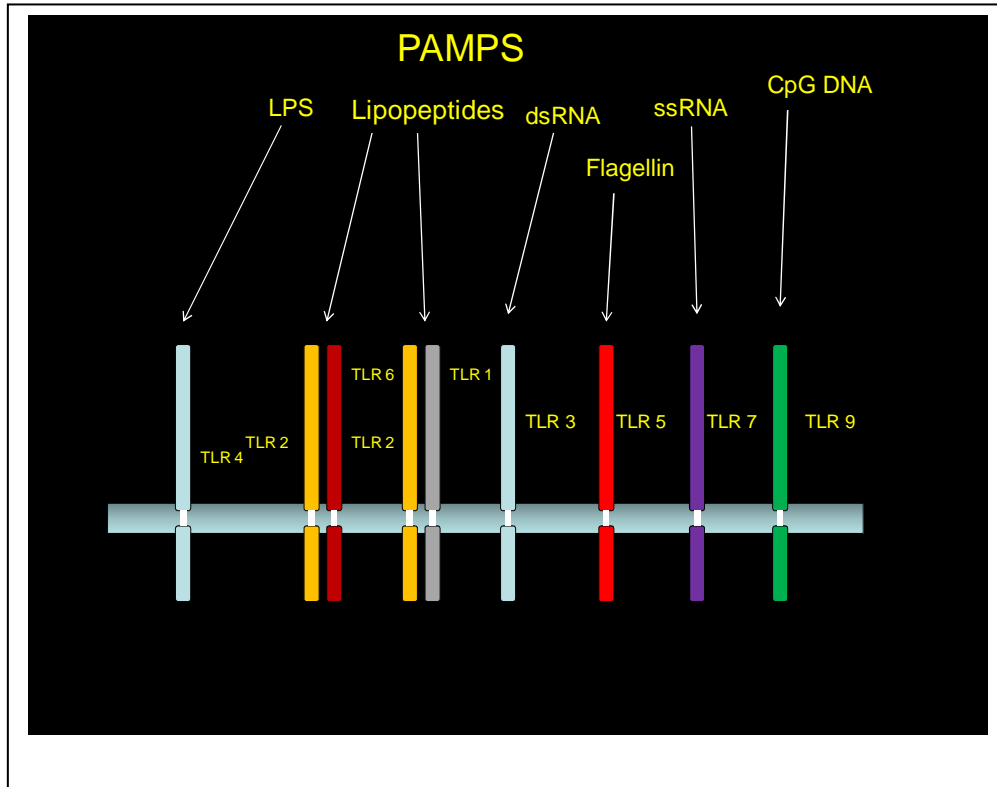


Figure N° 10 : Les différents TLR (Toll like receptor) et leurs ligands. Les TLR reconnaissent et répondent à de très nombreux ligands endogènes ou exogènes (PAMP : pathogen associated microbia pattern).

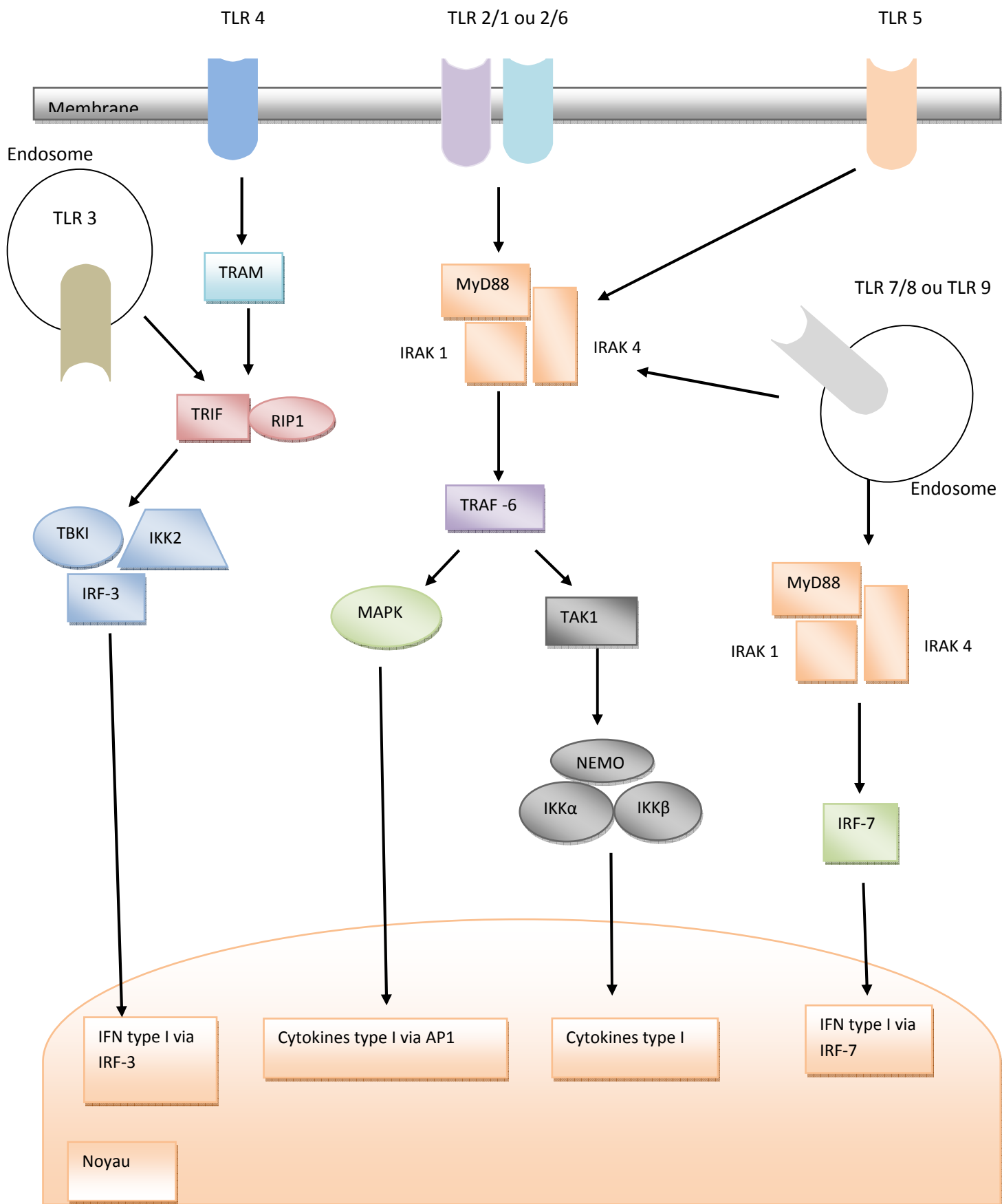


Figure N° 11 : Voies de signalisation des TLR.

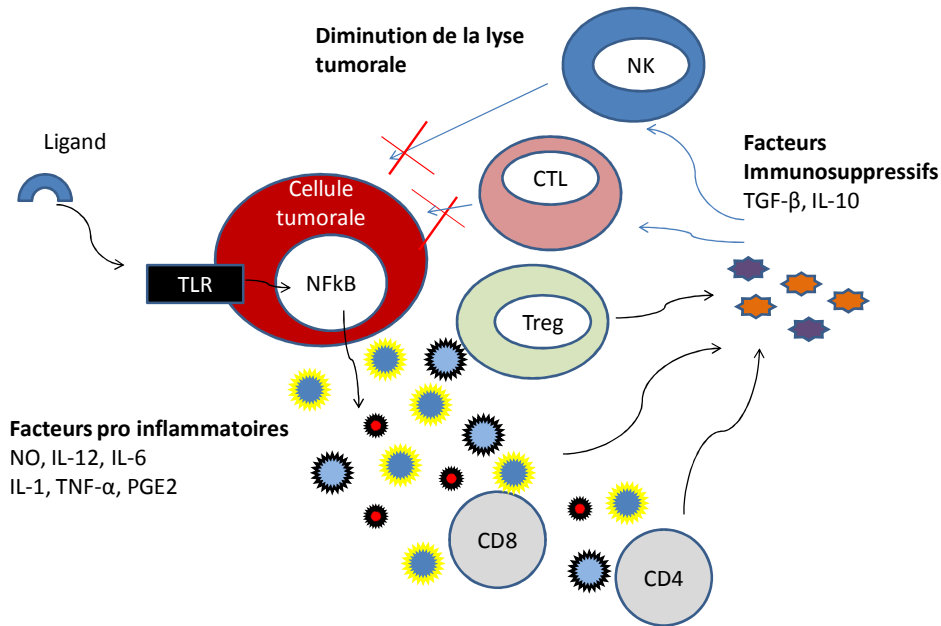


Figure N°12 : Régulation du système inné et adaptatif par la production de facteurs pro inflammatoires suite à la stimulation des TLR.

L'expression basale de B7-H1 et l'induction sont toutes les deux dépendantes d'IRF1 (IFN regulatory Factor) qui se situe entre 200 et 300 pb du début du site de transcription. L'expression de B7-H1 dans les lignées cellulaires est diminuée lorsqu'on inhibe MyD88, ou TRAF6 ou la voie MEK [190]. La voie jak2 est aussi impliquée dans l'induction de B7-H1 [190, 196]. Dans les cellules tumorales, la perte de PTEN entraîne une augmentation post transcriptionnelle de B7-H1 [197]. Il existe donc de nombreuses voies de signalisation impliquées dans la régulation de B7-H1.

Des expériences de blocage in vivo de PD-L1 ont été effectuées. Chez les souris KO pour PD-L1 (PD-L1^{-/-}), on voit apparaître rapidement des manifestations auto-immunes telles que des arthrites, lupus, glomérulonéphrites, cardiomyopathies. Les souris hétérozygotes pour PD-L1 ne présentent pas de manifestations auto-immunes [138]. Dans un modèle de souris pré-diabétiques (BDC2,5 /NOD TCR Transgénique), l'injection d'anticorps anti-PD-L1 ou anti-PD-1 entraîne l'apparition rapide d'un diabète même chez les souris mâles qui normalement ne développent pas cette pathologie. B7-H1 joue également un rôle dans les pathologies

inflammatoires chroniques et tumorales [198]. Les souris NOD SCID ne développent pas de tumeur ovarienne en cas de transfert simultané de lymphocytes, de cellules de carcinome ovarien humain et d'un anticorps anti B7-H1[138].

La molécule B7-H1 se lie au récepteur PD-1 (Programmed Death 1). Pendant plusieurs années l'hypothèse d'un autre récepteur était évoqué et depuis peu il a été mis en évidence une interaction avec B7.1 [168].

b. Récepteur PD-1

Le récepteur PD-1 comporte 288 acides aminés. Il appartient à la superfamille des immunoglobulines comme les molécules CD28 et CTLA-4 qui sont les récepteurs des molécules B7.1 et B7-2. Suite à la perte d'une cystéine dans sa portion proximale membranaire, PD-1 est un récepteur monomérique contrairement au CD28 ou CTLA-4 qui se dimérisent. Le domaine cytoplasmique comporte deux tyrosines, une constitue le domaine ITIM (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitor Motif) et l'autre le domaine ITSM (Immunoreceptor Tyrosine Switch Motif), celui-ci est indispensable pour le rôle inhibiteur de ce récepteur. PD-1 est exprimé pendant le développement thymique à la surface des CD4, des CD8⁺, sur les cellules T périphériques, sur les cellules B, les NK, les cellules dendritiques et sur les monocytes [199] (*Figure N°13*). Il est codé par le gène *Pdcd 1* qui se trouve sur le chromosome 1 chez la souris et sur le chromosome 2 chez l'homme. Il comporte 5 exons. L'exon 1 code pour une courte séquence signal, le 2 code pour le domaine Ig et les exons 3 et 4 codent pour la partie transmembranaire. L'exon 5 code pour la partie intra cellulaire c terminale et comporte un long domaine 3'UTR. Il existe plusieurs variants chez l'homme dont un qui a perdu le domaine transmembranaire et qui existe donc sous forme soluble. Ce variant joue un rôle non négligeable dans les pathologies auto immunes [200-201].

Un niveau très faible de PD-1 est suffisant pour assurer le rôle inhibiteur de l'activation des lymphocytes T. En cas de déficit en PD-1 (souris KO pour PD-1), l'administration de B7-H1 n'entraîne pas d'inhibition de l'activation des lymphocytes T. La fonction inhibitrice de B7-H1 passe donc bien par l'interaction avec son récepteur PD-1 [202]. La co-culture de lymphocytes T CD4⁺ et de cellules CHO (Chinese Hamster Ovary) exprimant B7-H1 ou B7-H2 suite à une transfection, entraîne une diminution de la prolifération des lymphocytes T et une diminution de production de cytokines. Il n'y a pas de mort cellulaire mais un arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1 [168]. Pourtant pour certaines équipes, la présence de B7-H1 et B7-H2 pourrait entraîner une prolifération des lymphocytes T, en entraînant une réponse immune Th2 [149].

Certains mutants pour B7-H1, ne permettant pas la liaison avec PD-1, peuvent quand même stimuler la prolifération des lymphocytes T en présence d'anticorps anti CD3. Ces mutants B7-H1 peuvent également stimuler les lymphocytes T KO pour PD-1. Ces deux éléments sont donc en faveur de l'existence d'un autre récepteur pour B7-H1.

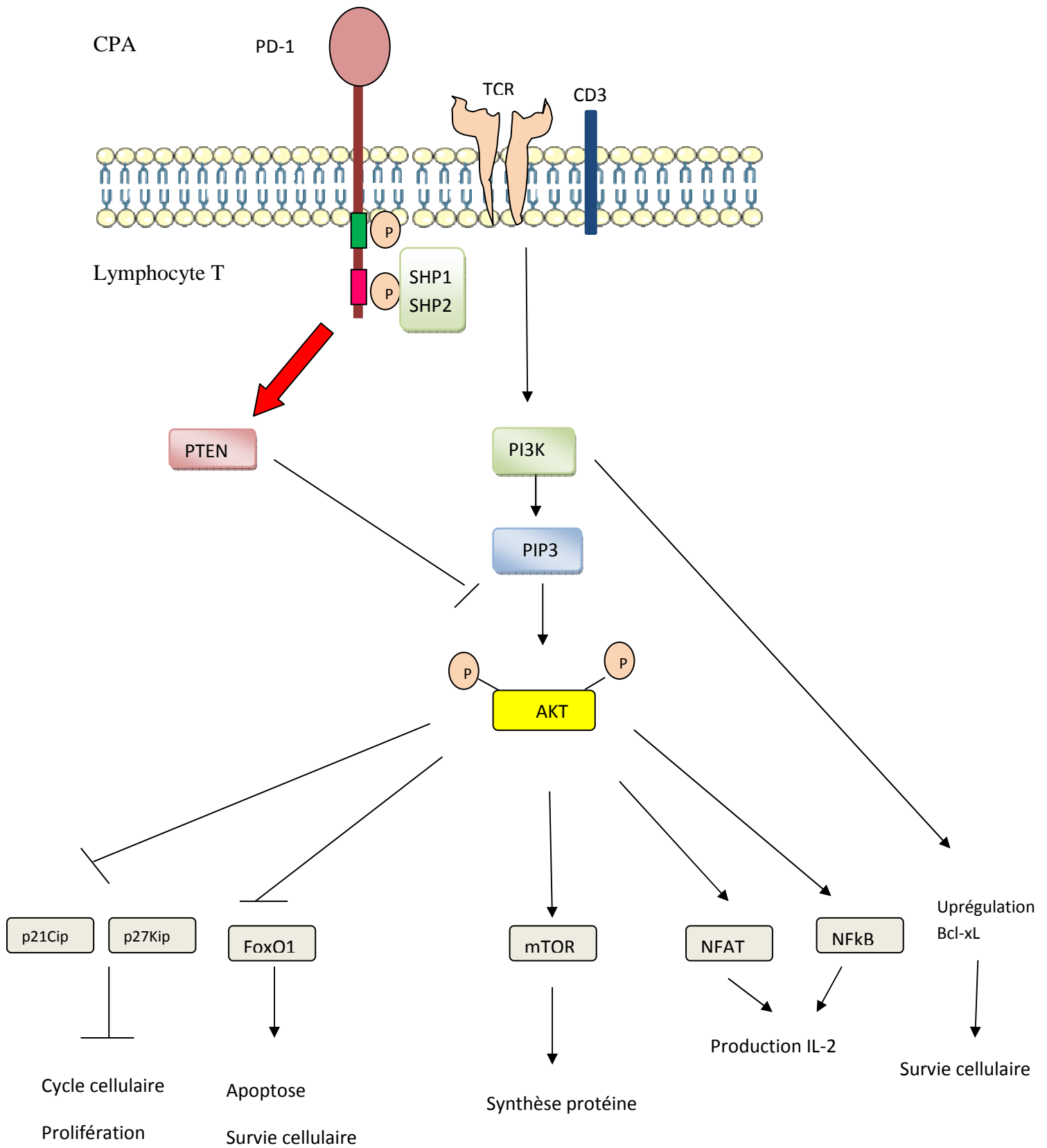


Figure N°13 : Structure du récepteur PD-1 et voies de signalisation.

c. Interaction B7-H1 et B7.1

Depuis plusieurs années, des résultats contradictoires étaient en faveur d'un autre récepteur non identifié pour B7-H1. Récemment, une nouvelle interaction entre B7-H1 et B7.1 a été mise en évidence [203]. Il existe une affinité intermédiaire ($1.7\mu\text{M}$) entre ces deux molécules par rapport à la liaison B7.1/CD28 ($4\mu\text{M}$), B7.1/CTLA-4 ($0.2\mu\text{M}$) et B7-H1/PD-1 ($0.5\mu\text{M}$). Il n'existe pas d'interaction ni entre B7-2 et B7-H1, ni entre B7-H2 et B7.1.

B7-H1 et B7.1 peuvent interagir au niveau de leur domaine IgV like [202]. Cette liaison va induire un signal inhibiteur sur les lymphocytes T avec une diminution de la prolifération et une diminution de production de cytokines.

Tout ceci a été démontré par différents modèles de souris KO pour les différents intervenants (B7.1, B7-H1, CD28, CTLA-4). Il existe un signal bidirectionnel entre B7-H1 et B7.1 (*Figure N°14*).

Cette nouvelle découverte permet de mieux comprendre des résultats discordants in vitro, dans l'utilisation de différents anticorps bloquants : PD-1, B7-H1, B7-H2. Certains anticorps, comme le 10F.9G2, bloquent à la fois l'interaction entre B7-H1/PD-1 et entre B7-H1/ B7.1, alors que d'autres vont uniquement inhiber l'une ou l'autre des interactions et vont donc avoir moins d'effet sur l'activation des lymphocytes T. Les molécules B7-H1 et B7.1 sont toutes deux exprimées au niveau des lymphocytes T, des lymphocytes B, des cellules dendritiques et des macrophages. Il existe donc une possibilité d'interaction bidirectionnelle au niveau de ces cellules. De plus, B7-H1, exprimé sur les cellules non hématopoïétiques, peut interagir avec B7-H1 et PD-1 pour réguler les lymphocytes.

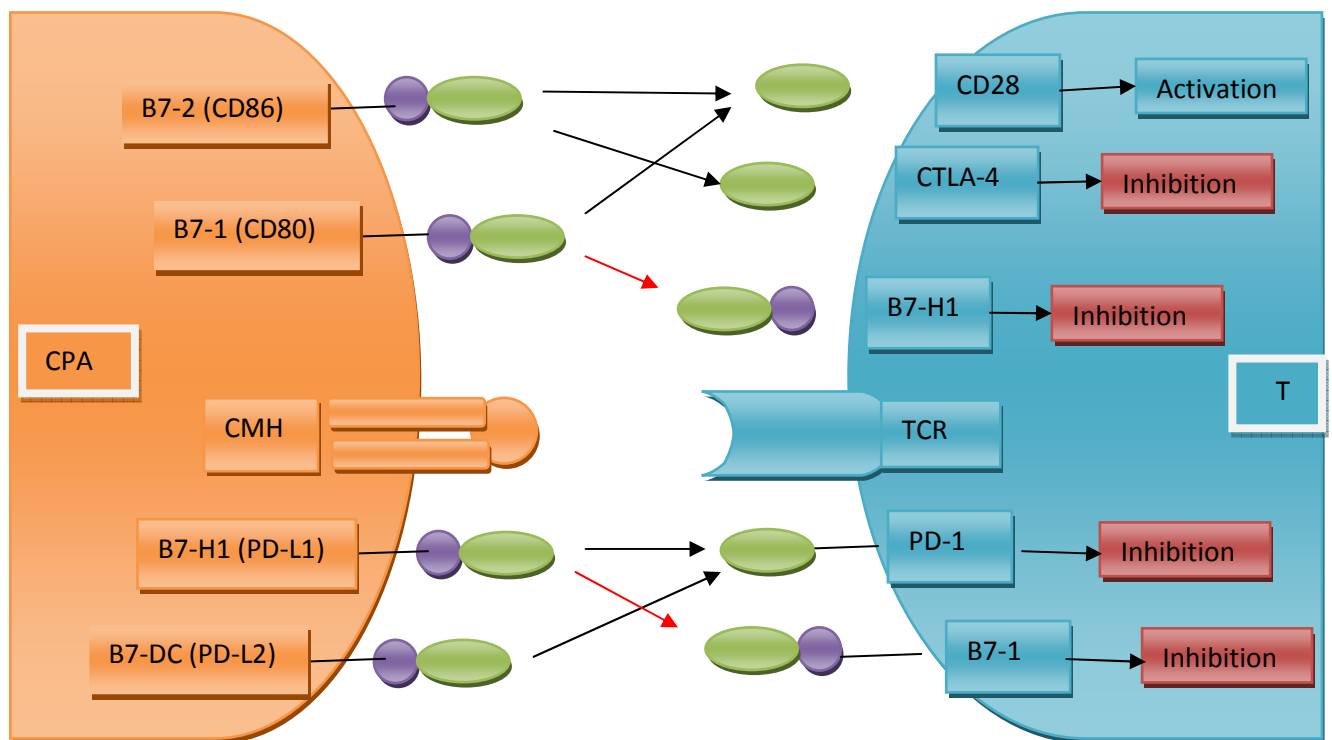


Figure N°14 : Interaction B7-H1 et B7.1. Les régions variables des Immunoglobulines sont en violet et les régions constantes sont en vert. CPA : cellules présentatrices d'antigènes, T : lymphocyte T.

d. B7-H1 et hémopathies

L'expression de B7-H1 a été évaluée dans de nombreuses tumeurs solides mais aussi dans différentes hémopathies, le *Tableau N°4* rend compte des différentes études de la littérature.

Lymphomes et leucémie lymphoïde chronique

Dans les lymphomes, il existe une expression hétérogène de B7-H1. Il est retrouvé dans 27% des lymphomes à grandes cellules B, dans 100% des lymphomes primitifs du médiastin, dans 20% des lymphomes T lié à HTLV1. Il n'est pas retrouvé dans les lymphomes folliculaires, les lymphomes à petites cellules, les lymphomes de la zone marginale, les lymphomes de Burkitt et les lymphomes du manteau. Ces résultats ont été confirmés par plusieurs équipes [181, 204-207]. Dans les leucémies lymphoïdes chroniques, les cellules tumorales expriment à leur surface à la fois PD-1 et B7-H1. Il n'existe pas de corrélation avec les différents paramètres clinico biologiques, et aucune valeur pronostique n'a été identifiée [208].

Ce qui est intéressant au sein des LNH à grandes cellules B, c'est que seuls les lymphomes ayant un profil non GCB (Germinal center B) expriment B7-H1. Ceci a été mis en évidence sur des lignées de lymphomes et sur des échantillons tumoraux humains. Ce sous groupe de lymphomes à grandes cellules B est de moins bon pronostic, on peut donc se poser la question de l'implication de B7-H1 dans ce mauvais pronostic [209]. Pour les lymphomes T, seuls les lymphomes angioimmunoblastiques T expriment à leur surface B7-H1. Les cellules de Reed Sterneberg de la maladie de Hodgkin expriment également à leur surface B7-H1 [210].

Dans les différentes lignées de lymphomes, l'expression de B7-H1 n'est pas induite par les cytokines telles que l'IFN- γ , l'IL-6, ou l'IL-10 [204]. Il existerait aussi une perte de l'expression de B7-H1 au fur et à mesure de la culture in vitro des lignées cellulaires et en fonction du milieu de culture.

L'équipe de Mazec en 2008 a pu mettre en évidence le rôle direct d'un oncogène sur le contrôle d'expression d'une molécule immunosuppressive de surface. Les cellules de lymphomes T ALK⁺ expriment à leur surface la molécule B7-H1. La protéine chimérique NPM/ALK est activée de manière constitutionnelle avec activation de STAT3. Pour démontrer le rôle direct entre ALK et B7-H1, ils ont réalisés des transfections stables avec ou sans la protéine de fusion NPM/ALK. La présence de cette protéine de fusion entraîne l'expression de B7-H1 sur les cellules. En utilisant différents inhibiteurs chimiques des voies de signalisation ils ont pu démontrer le rôle de STAT3 dans l'expression de B7-H1 [206].

Cependant des résultats contradictoires ont été démontrés par l'équipe de Yamamoto en 2009 avec l'implication de la voie MEK-ERK pour l'expression basale de B7-H1 et secondairement l'implication de STAT3 et de MEK/ERK pour l'induction [211]. Ces différences pourraient s'expliquer par l'utilisation de lignées murines différentes et des concentrations d'inhibiteurs différentes. Dans les lignées de Hodgkin, les voies de régulation de B7-H1 seraient plutôt la voie Erk et les MAP kinase [211].

L'équipe de Green en 2010, a mis en évidence dans certaines lignées de maladies de Hodgkin et de lymphome primitif du médiastin une amplification chromosomique au niveau de la région 9p24.1. Ils ont pu démontrer que cette amplification entraîne une augmentation de l'expression de B7-H1 au niveau des cellules tumorales. Cette hyper expression se fait soit de manière directe en augmentant le nombre de copie du gène, soit de manière indirecte en augmentant l'expression de Jak2 qui va lui-même induire l'expression de B7-H1 [212]. Cependant les cellules de maladie de Hodgkin peuvent exprimer B7-H1 à leur surface sans avoir pour autant systématiquement une amplification en 9p24.1. La même équipe a mis en évidence l'implication du site de liaison AP-1 qui se trouve sur l'intron 1 du gène B7-H1. Celui ci peut être stimulé par EBV LMP-1 (latent membrane protein 1) qui va augmenter l'expression de B7-H1 en passant par jak3 [213]. Le virus EBV est impliqué dans 40% des maladies de Hodgkin et dans la majorité des lymphomes post transplantation. Ces deux mécanismes impliquant soit une amplification en 9p24.1 soit passant par AP-1 sont mutuellement exclusifs (*Figure N°15*).

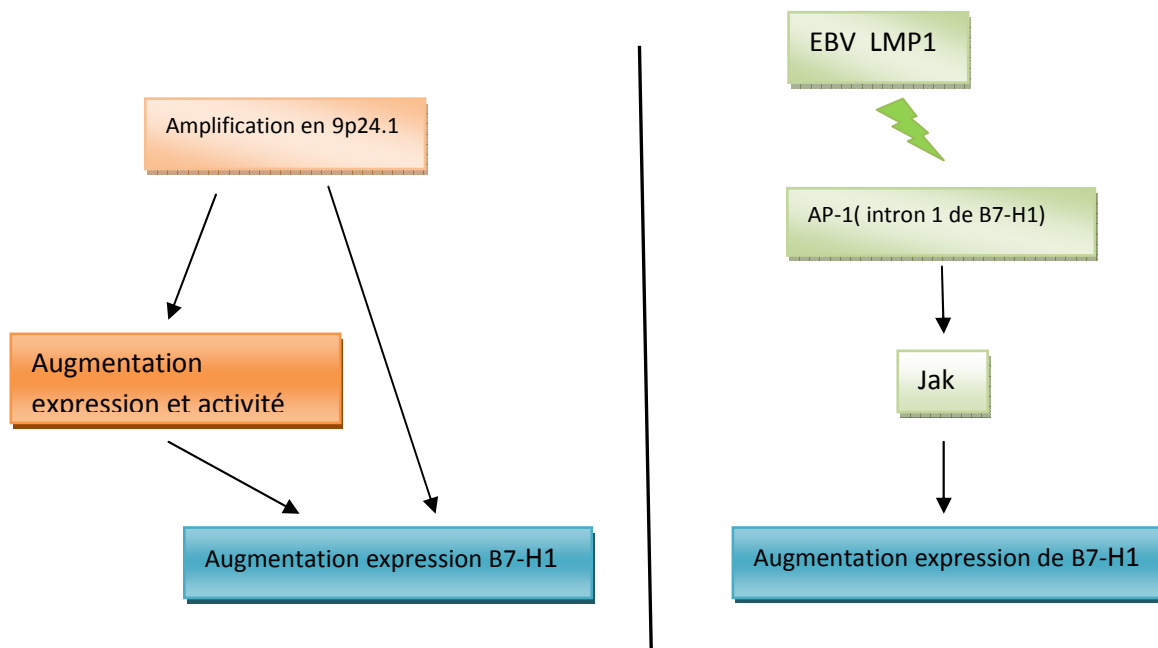


Figure N° 15 : Mécanismes d'expression de B7-H1 dans les lymphomes de Hodgkin.

Myélome multiple (MM)

L'équipe d'Iwai a montré que de nombreuses lignées de MM expriment B7-H1. L'administration d'anticorps bloquant B7-H1 associé à des cellules tumorales dans des souris syngéniques diminue la vitesse de croissance tumorale. Celle-ci est complètement supprimée chez des souris déficientes en PD-1 [214].

Notre équipe a pu démontrer que B7-H1 était exprimé par les cellules CD138⁺ des patients présentant un MM mais pas sur les cellules CD138⁺ de donneurs sains ou de patients présentant des MGUS (gammopathie monoclonale). L'expression de B7-H1 est augmentée après stimulation par l'IFN- γ et par les ligands des TLR 2 (peptidoglycanes), 4 (LPS) et 9 (oxydésoxynucléique ODN). Cette induction passe principalement par la voie MyD88/TRAF6 et MEK/ERK et de manière moins importante par Jak/STAT/IRF-1 [190] (*Figure N°16*). Il existe une petite population de cellules prélevées chez des patients CD34⁺CD138⁺B7-H1⁺ capable de proliférer chez des souris immunodéficientes [215]. L'équipe de Bao retrouve aussi les mêmes résultats pour les TLR avec des résultats supplémentaires pour les TLR 1, 3, 5, 6 et 7. Ils ont pu aussi mettre en évidence la fonctionnalité des TLR et leur rôle dans la prolifération, la survie et la réponse à la chimiothérapie pour les plasmocytes tumoraux [216]. La stimulation des TLR par leurs ligands respectifs entraîne une prolifération et une survie plus importante des cellules tumorales.

Benson a pu tout d'abord montrer que les cellules NK de donneurs sains n'expriment pas le récepteur PD-1 alors que les NK de patients présentant un MM, expriment PD-1 à leur surface. D'autre par, le lénalidomide diminue l'expression de B7-H1 sur les plasmocytes malins. L'administration de CT-011 (inhibiteur de PD-1) seul ou en association avec le lénalidomide entraîne une augmentation de l'activité cytotoxique des NK sur les cellules myélomateuses [217].

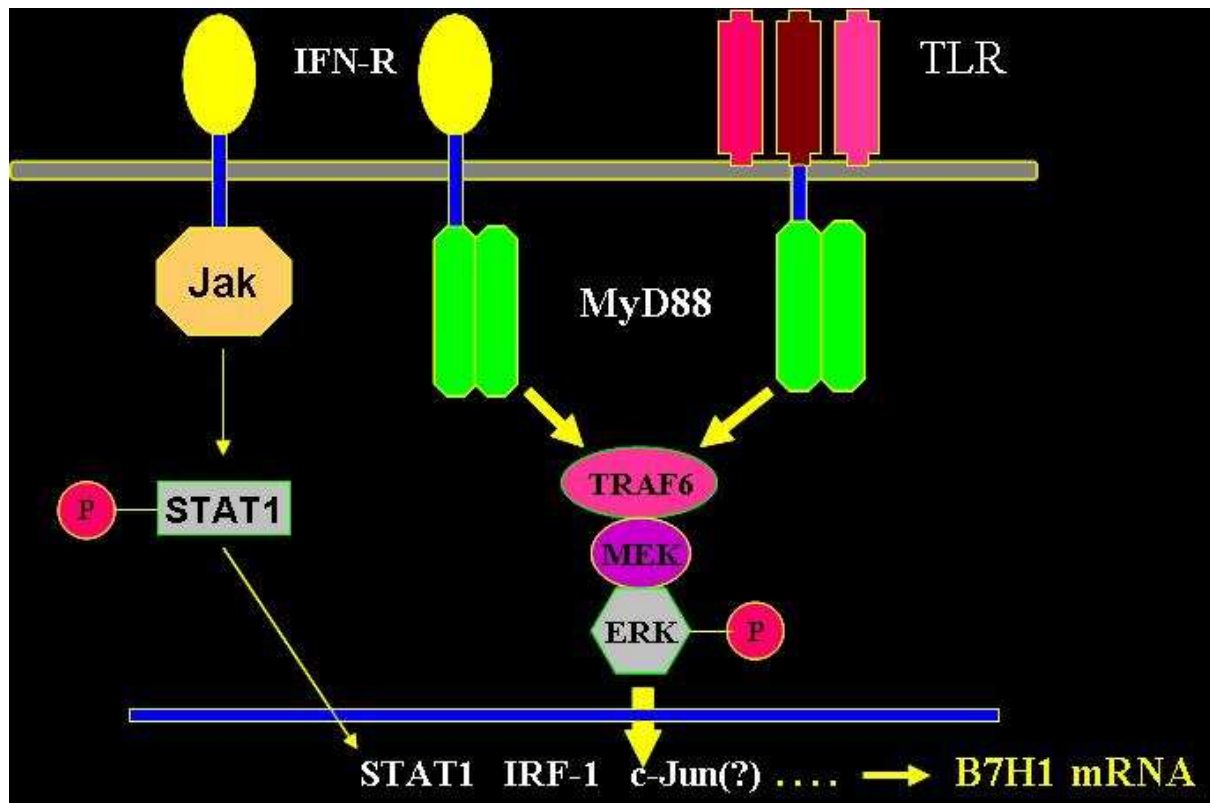


Figure N°16: Voies de signalisation de B7-H1 dans les myélomes multiples.

Leucémie aigue et syndromes myélodysplasiques

Dans les leucémies aigues myéloïdes, les résultats sont contradictoires quant à l'expression de B7-H1 au niveau des blastes.

Tout d'abord en 2005, Tamura et son équipe ont retrouvé une expression rare de B7-H1 sur les blastes avec surtout une expression de B7.2 dans 28.9% et B7-H2 dans 15.3% des cas. Pour les patients qui ont une expression de B7-H2 sur plus de 25% des blastes, ils observent une survie plus courte. B7.2 est corrélé avec l'hyperleucocytose. B7.2 et B7-H2 induisent la prolifération de lymphocytes T CD4⁺ et la sécrétion d'IL-4 et IL-10 in vitro. L'expression de B7-H2 est induite par le TNF- α et non l'IFN- γ [156].

A contrario, l'équipe de Salih en 2006 a montré l'existence de l'expression de B7-H1 sur des lignées de LAM et sur des échantillons primaires (dans 57% des cas), et n'a retrouvé aucune corrélation clinique. Ils n'ont pas montré d'implication de cette molécule dans la prolifération des lymphocytes T (en étudiant ICOS et CD69) et la production d'IFN- γ et IL-2 [218].

Pour Chen, les blastes de LAM expriment bien B7-H1. Il existe une corrélation clinique avec les LAM de type 5 Fab. L'expression de cette molécule est augmentée au moment des rechutes par rapport au diagnostic. Il montre également que l'expression de B7-H1 est un facteur de mauvais pronostic avec une survie plus courte pour les patients qui l'expriment [219].

Kondo a pu montrer que les blastes des syndromes myélodysplasiques pouvaient exprimer B7-H1. Cette expression est induite par l'IFN- γ et le TNF- α . Il rapporte également que l'expression de B7-H1 entraîne une prolifération plus importante. Ce gain de prolifération est corrélé avec une incidence plus élevée de l'expression de B7-H1 dans les SMD de haut risque qui sont prolifératifs [155].

Dans un modèle murin de leucémie aigue myéloïde, Zhou a pu mettre en évidence l'intérêt de réaliser une déplétion en lymphocytes T reg et l'administration d'anticorps bloquant PD-1 pour éliminer les cellules leucémiques [220]. Le blocage de PD-1/B7-H1 couplé avec une déplétion en T reg représente une nouvelle approche thérapeutique en clinique. Dans un autre modèle (C1498 cellules murines leucémiques), l'utilisation de souris KO PD1^{-/-} ou l'utilisation d'anticorps bloquant B7-H1 entraîne la génération de lymphocytes T anti tumoraux avec une diminution de la blastose circulante et de la taille des organes hématopoïétiques associé à une augmentation de la survie des souris [221].

Allogreffes de cellules souches hématopoïétiques

Dans de nombreuses pathologies hématologiques, l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques semble aujourd'hui encore le meilleur traitement. Cette technique n'est pas envisageable chez tous les patients de part une toxicité non négligeable liée au risque de GVHD. De plus il existe encore des rechutes post allogreffe suite avec un effet GVL insuffisant.

La molécule B7-H1 est impliquée dans les mécanismes d'évasion tumorale post greffe. Un des principaux modèles d'étude de la GVH et de la GVL est l'allogreffe de patients atteints de leucémie myéloïde chronique. Les patients greffés en phase blastique ont moins d'effet GVL. L'équipe de Mumprecht a d'abord montré que l'expression de PD-1 sur les lymphocytes T CD8⁺ est plus importante dans les phases blastiques que dans les phases chroniques. Les cellules myéloïdes leucémiques suppriment la prolifération des T via l'interaction entre PD-1 et B7-H1. Le blocage de PD-1/B7-H1 dans les phases blastiques augmente la survie des souris et les souris déficientes en PD-1 dans les crises blastiques ont une survie plus longue [222]. L'effet GVL est augmenté chez les souris KO pour B7-H1, mais en phase chronique uniquement et non en phase blastique. Il existe donc un mécanisme intrinsèque aux cellules en phase blastique qui les protège des lymphocytes T [223].

L'effet GVL diminue avec le temps, il est associé avec une diminution de l'expansion des cellules T et une augmentation de PD-1 sur les lymphocytes T. L'administration d'anticorps bloquant B7-H1 restaure l'effet GVL sans entraîner de GVH [224-225]. L'expression de B7-H1 sur les progéniteurs myéloïdes leucémiques inhibe les lymphocytes T. Le blocage de B7-H1/PD-1 entraîne une augmentation de la prolifération de lymphocytes T CD8⁺ mémoire [226]. Il existe donc un intérêt clinique à bloquer cette interaction dans les rechutes post allogreffe de moelle. Une autre perspective thérapeutique est la vaccination anti tumorale avec des si-RNA de B7-H1 car les cellules dendritiques KO pour B7-H1 vont permettre une activation des lymphocytes T avec une augmentation de la production de l'IFN- γ et de l'IL-2 [227].

	Expression de B7-H1 sur les cellules tumorales	
LAM (Leucémie aigue myéloïde)	25%	[84, 156, 218-221]
SMD (Syndromes myélodysplasiques)	< 25%	[155]
DLBCL (Lymphome diffus à grandes cellules B)	25%	[204, 209, 211-212]
PMBCL (Lymphome B primitif du médiastin)	>50%	[212]
FL (Lymphome folliculaire)	0 %	[204]
LLC (Leucémie lymphoïde chronique)	35%	[208]
HL (Maladie de Hodgkin classique)	90%	[210, 212-213]
MM (Myélome multiple)	> 50%	[190, 214-217]
PTCL-U (Lymphome T périphérique)	20%	[207, 228]
AITL (Lymphome angio immunoblastique)	Rare	[228]
ALCL, ALK+ (Lymphome anaplasique)	33%	[206, 211, 228]
ALCL, ALK- (Lymphome anaplasique)	15%	[146, 228]
ATLL (Lymphome T de l'adulte)	20%	[207]
CTCL (Lymphome cutané T)	25%	[228]

Tableau N°4 : Niveau d'expression de la molécule B7-H1 sur les cellules tumorales de différentes hémopathies.

e. Les mécanismes d'action immunologique

Il a été montré que B7-H1 jouait un rôle inhibiteur de la lyse des cellules tumorales médié par les CTL (lymphocytes T cytotoxiques) [61]. Les mécanismes mis en jeu sont complexes (*Figure N°17*).

Apoptose des lymphocytes T :

La co-culture de lignées de cellules tumorales exprimant B7-H1 avec des cellules T humaines (TAA Tumor associated Antigens) entraîne une augmentation d'apoptose des lymphocytes T TAA. L'utilisation d'anticorps bloquant anti B7-H1 réduit les phénomènes d'apoptose [61]. Il s'agit d'un phénomène physiologique pour maintenir l'homéostasie dans les tissus périphériques. Par exemple, les souris KO pour B7-H1 ont une accumulation de lymphocytes T CD8⁺ dans les cellules hépatiques liée à une diminution de l'apoptose [229]. L'induction de l'apoptose ne passe pas forcément par l'activation de PD-1 ; les mécanismes ne sont pas encore vraiment élucidés.

Anergie des lymphocytes T :

Ce rôle a été mis en évidence par la co-culture de lymphocytes T alloréactifs et de cellules dendritiques traitées par de l'IL-10. L'anergie est réversible si les cellules dendritiques sont traitées par un anticorps anti B7-H1 [230]. Un autre travail a mis en évidence l'implication de PD-1 dans ce mécanisme [231]. L'anergie des lymphocytes T peut survenir dans les différentes phases de la lymphopoïèse (phase initiale et phase effectrice) [232-233].

Exhaustion:

Ce mécanisme a été mis en évidence initialement dans les infections virales chroniques. La stimulation répétée de PD-1 via B7-H1 entraîne un épuisement des lymphocytes T dans les infections chroniques. Le blocage de B7-H1 restaure la fonction des lymphocytes T [234-235]. Les cancers peuvent être considérés comme des pathologies inflammatoires chroniques. Les cellules dendritiques du microenvironnement tumoral expriment fortement B7-H1 [163], le blocage de B7-H1 entraîne une augmentation d'activité des lymphocytes T effecteurs. De plus les lymphocytes T infiltrant les tumeurs expriment fortement PD-1. Le blocage de celui-ci augmente également aussi la prolifération et la fonction des lymphocytes T. Ces deux éléments pris ensemble confirment le rôle de B7-H1 et PD-1 dans l'épuisement des lymphocytes T.

Molecular shield :

L'utilisation d'anticorps monoclonaux bloquant B7-H1 ou PD-1 entraîne l'augmentation de la lyse des cellules tumorales par les lymphocytes T cytotoxiques spécifiques [49, 164, 236-237]. On peut en déduire que le niveau d'expression de B7-H1 est suffisant pour conférer à la tumeur une résistance contre la lyse des lymphocytes T cytotoxiques. Cette donnée est également validée par des modèles expérimentaux dans lesquels on observe une expression forte de B7-H1 : la lyse par les T CD8⁺ y est moins importante [236]. Ce mécanisme de résistance aux lymphocytes T est lié à l'interaction entre B7-H1 et PD-1 : on parle alors de « molecular shield » ou « bouclier moléculaire » [236].

Enfin, on observe que les lymphocytes T spécifiques sont plus efficaces dans les tumeurs qui expriment faiblement B7-H1 avec PTEN WT que dans les tumeurs mutées PTEN avec expression forte de B7-H1 [197]. L'acquisition de résistance survient rapidement avec des T allogéniques ou des T spécifiques. Cela permet d'identifier le rôle de PD-1.

Grâce à la construction d'un système de mutagenèse dirigé de B7-H1, il a été démontré que seule sa partie intra cellulaire de celui-ci était nécessaire au maintien du bouclier moléculaire. Les modifications de celle-ci entraînent la lyse des cellules tumorales par les lymphocytes T. On n'observe aucun effet sur la lyse tumorale si les modifications portent sur la partie extra cellulaire de PD-1 [238].

Production d'IL-10 :

On observe une production d'IL-10 lorsque les lymphocytes T sont stimulés par un anticorps anti CD3 et une protéine de fusion B7-H1 [149]. Les cellules dendritiques tumorales exprimant B7-H1 produisent aussi de l'IL-10 [163]. Plusieurs études ont montré une corrélation entre le niveau d'expression de B7-H1 et la concentration en IL-10 dans des infections virales chroniques telles que le HIV ou l'hépatite B [239-240]. Le rôle exact de l'IL-10 dans l'inhibition de la lyse par les lymphocytes T n'est pas encore connu.

Suppression T reg :

Il a été démontré in vitro que les cellules endothéliales vasculaires et les cellules épithéliales gastriques induisaient la production de T reg [240-241]. Cela n'a pas été démontré in vivo. Dans des modèles tumoraux murins, on observe une activation des T reg par les cellules

dendritiques IDO^+ qui induisent alors l'expression de B7-H1 sur les cellules dendritiques. En parallèle, il est possible d'inhiber les T reg par l'utilisation d'anticorps anti B7-H1 [242].

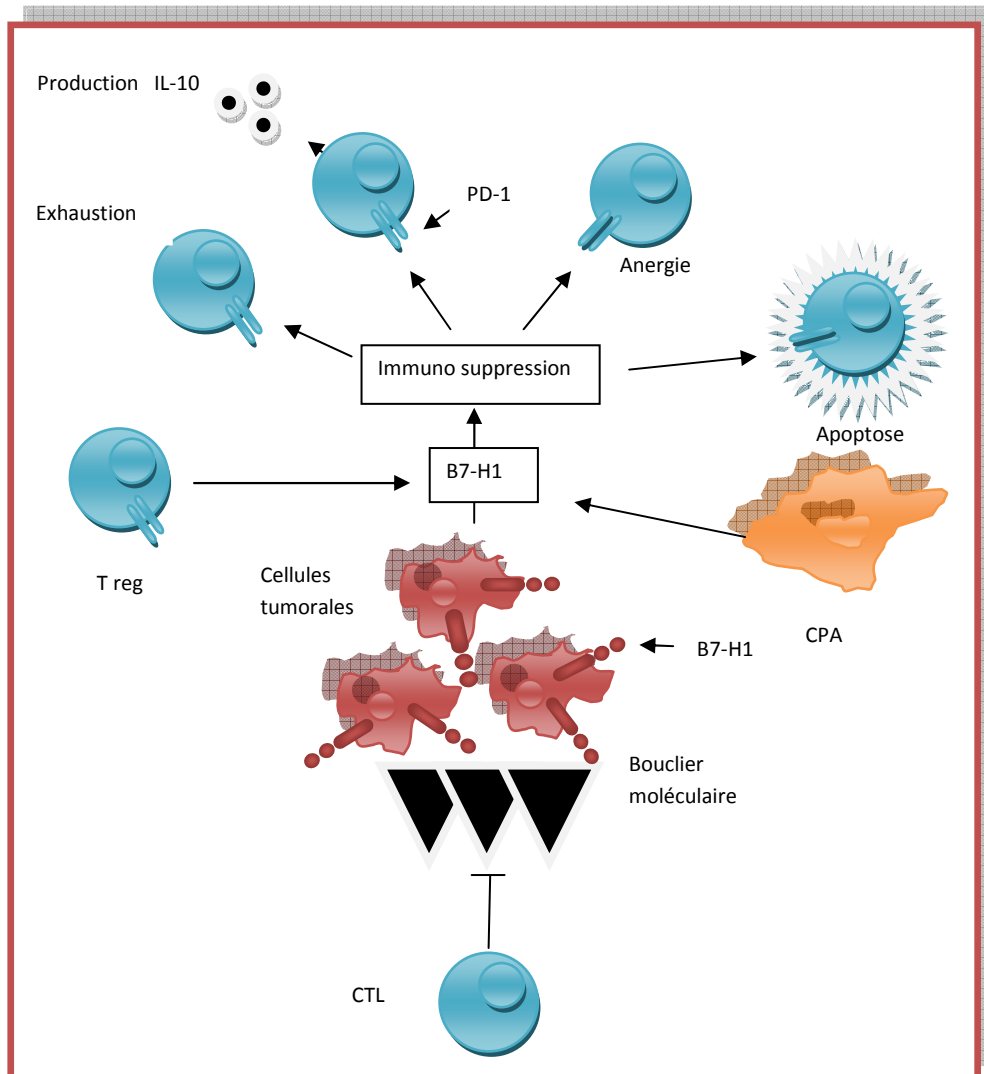


Figure N°17 : Actions inhibitrices de B7-H1 dans l'immunoévasion. T reg : T régulateurs, CPA : cellules présentatrices d'antigènes, CTL : lymphocyte T cytotoxiques

L'équipe de Tsushima a montré que l'interaction entre B7-H1 et PD-1 entraînait une anergie de manière très précoce des lymphocytes T naïfs au sein des ganglions lymphatiques [232]. L'affinité entre B7-H1 et PD-1 est plus importante que celle entre B7.1 et CD28, mais moins importante qu'entre B7.1 et CTLA-4 ou B7-H1 et PD-1 [203]. L'initiation de la réponse immune et sa maintenance sont donc liées. Cela passe par l'inhibition de la prolifération et la production de cytokines (IFN- γ , TNF- α).

En plus de réguler les lymphocytes T, la famille B7 a une influence sur l'activation des cellules NK. Les NK des patients atteints de myélome multiple ont une expression plus élevée de PD-1 que ceux de donneurs sains. Les cellules de myélome expriment fortement B7-H1, le blocage de PD-1 par anticorps monoclonal entraîne une augmentation de la lyse tumorale via les NK. [217]. A l'inverse, B7-H2 et B7-H6 augmentent l'activité cytotoxique des NK.

Les molécules de la famille B7, ont non seulement un rôle dans la régulation de la réponse immune via leur expression à la surface des cellules tumorales, mais sont également exprimées par le microenvironnement tumoral. Elles sont impliquées dans la niche favorable à la croissance des cellules tumorales. Cela a été décrit dans les syndromes lymphoprolifératifs T [228]. L'expression de B7-H1 sur les cellules tumorales ou par les cellules dendritiques du microenvironnement régule l'induction et la fonction des T reg dans de nombreuses pathologies hématologiques [243-245].

L'expression des molécules de la famille B7, par les cellules tumorales, a un impact pronostic défavorable comme l'ont démontré plusieurs équipes [154, 167, 246]. Ce rôle péjoratif était initialement attribué uniquement à l'action de ces molécules sur les cellules immunologiques. Récemment, a été mise en évidence une implication de celles-ci dans la survie cellulaire.

En effet, la molécule B7-H1 est aussi exprimée sur les lymphocytes T, mais sa fonction exacte n'est pas encore bien connue. On note un pic d'expression de B7-H1 sur les lymphocytes T CD8⁺ au moment de la phase de contraction. Grâce à un modèle de souris qui ont un TCR transgénique déficient (OT-1), l'équipe de Pulko a pu mettre en évidence tout d'abord que les lymphocytes T CD8⁺B7-H1 déficients naïfs prolifèrent de manière normale. Cependant, dans la phase d'activation, il existe in vitro plus d'apoptose et in vivo, plus de contraction. Ces lymphocytes sont plus sensibles à la voie Ca-dépendant et à la voie Fas/Fas ligand. Dans la phase d'activation les lymphocytes T CD8⁺ déficient B7-H1 ont une activation de Bcl-xl moins forte. L'expression de B7-H1 sur les lymphocytes T permet donc leur survie dans la phase de contraction et donc un rôle protecteur optimal [247].

La découverte récente de l'interaction entre B7-H1 et B7.1 repose la question du rôle de celle-ci dans l'inhibition des lymphocytes T. Le blocage spécifique de cette interaction entraîne une augmentation de l'expansion des lymphocytes T, comme l'a montré l'équipe de Park. Cela permet d'empêcher l'induction de l'anergie. L'utilisation de cet anticorps peut restaurer l'activité des lymphocytes T anergiques. Cette interaction est donc cruciale dans la régulation de l'induction et de la maintenance de la tolérance des lymphocytes T [248].

La molécule B7-H1 présente un intérêt supplémentaire car elle participe au phénomène de « dormance » tumorale (persistance de cellules tumorales dans l'organisme pendant plusieurs mois voir plusieurs années après les différents traitements, phénomène expliquant les rechutes). Il existe différents modèles de dormance tumorale [249].

L'équipe du laboratoire a mis en place un modèle murin de dormance tumorale (*Figure N°18*). Nous avons montré la persistance de cellules leucémiques en faible quantité plus d'un an après l'injection initiale chez des souris immunocompétentes [49, 250-251]. Il s'agit d'un modèle leucémique murin de dormance possédant le transcrit BCR-ABL (DA1-3B). La première partie de construction a été de réaliser une transfection stable du transcrit BCR-ABL dans des cellules murines leucémiques (Da1). Cette transfection stable a entraîné une indépendance à l'IL3. Les souris ont alors été vaccinées avec une injection de cellules DA1-3b IL12 ou DA1-3B CD154 irradiées au préalable. Ensuite elles ont reçu de manière répétée des injections de cellules DA1-3b vivantes. Les souris non vaccinées ont rapidement développé une leucémie aigue, ce qui n'a été observé que dans une partie seulement des souris vaccinées. Les souris vaccinées vivantes à un an ont été sacrifiées. On y retrouve des cellules dormantes en faible quantité (1000 voire parfois 100 cellules), cellules qui sont capables d'induire une leucémie aigue chez de nouvelles souris. Une toute petite quantité de cellules peut donc être à l'origine de la dormance tumorale. Ces cellules s'avèrent plus résistantes à la lyse par les lymphocytes T cytotoxiques. L'équipe au sein du laboratoire a pu mettre en évidence sur ces cellules « dormantes » une augmentation de l'expression de B7-H1 et B7.1. Le blocage de l'une de ces molécules in vivo permet de prolonger la survie des souris naïves chez qui ces cellules « dormantes » ont été injectées. Les cellules dormantes développent des mécanismes qui leur permettent d'échapper aux drogues et au système immunitaire (*Figure N°19*).

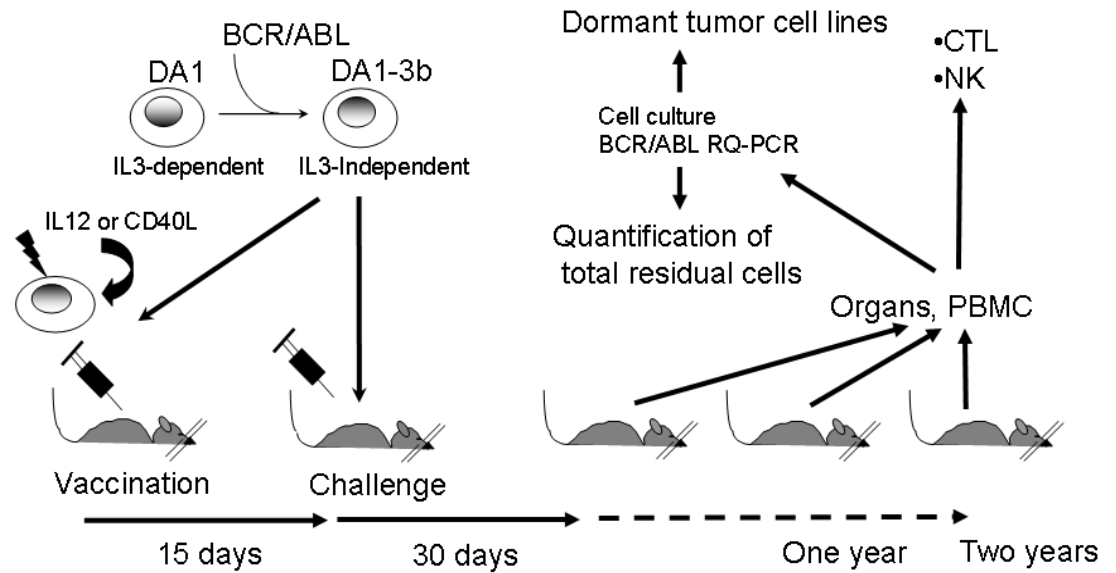


Figure N°18: Modèle DA1-3b de dormance tumorale. Les souris C3H/HeJ ont été vaccinées avec des cellules DA1-3b irradiées au préalable transfectées avec IL12 ou CD40L. Ensuite les souris ont été challengées avec réinjections de cellules DA1-3B. Les souris survivantes sont sacrifiées à différents temps pendant 1 an. La maladie résiduelle est quantifiée par RT-PCR sur BCR/ABL au niveau de tous les organes et les cellules sont remises en culture afin d'obtenir une nouvelle lignée de cellules.

Un autre travail au sein du laboratoire a été de vacciner des souris avec des DA1-3B transfectées avec CXCL10. Il s'agit d'une chemokine qui attire les cellules T et les NK. Cette vaccination a permis d'établir une forte immunité. Les souris ne meurent pas mais cette fois-ci il n'y a pas de cellules dormantes dans la rate et le foie des souris sacrifiées à 1 an. L'effet protecteur de cette vaccination est supprimé en cas de déplétion en NK et est partiellement inefficace en cas de déplétion en lymphocyte CD4⁺ ou CD8⁺. Cette vaccination est dépendante de l'IFN- γ et indépendante du TNF- α . Après la vaccination, les cellules NK expriment à leur surface B7-H1 qui va induire la prolifération de lymphocytes T et la production d'IFN- γ et TNF- γ . L'inhibition de B7-H1 enlève l'effet protecteur de cette vaccination DA1-3B- CXCL10. CXCL10 induit donc un effet anti-leucémique qui passe en partie par la stimulation des NK qui expriment B7-H1 [251].

Les cellules « dormantes » du modèle DA1-3B sont plus résistantes à la lyse par les lymphocytes T cytotoxiques [49]. Ces cellules ont une expression plus faible de SOCS1 et une activation de la voie Jak/Stat par un phénomène de méthylation du gène Socs1. La déméthylation de ce gène ou l'inhibition de Jak/Stat vont entraîner une augmentation de la lyse des cellules dormantes par les lymphocytes T cytotoxiques [252].

f. Les mécanismes non immunologiques

En dehors de leurs rôles immunologiques, les membres de la famille B7 ont d'autres fonctions mises en évidence récemment : une fonction anti apoptotique directe, une augmentation de la résistance à la chimiothérapie et un rôle dans le processus de transition épithélio-mésenchymateux.

L'équipe d'Azuma en 2008, a démontré que B7-H1 pouvait transmettre directement à la cellule cancéreuse un signal anti apoptotique en ayant lui-même une fonction de récepteur. Cela passe par un mécanisme de signalisation inversée [238]. La liaison de PD-1 avec B7-H1 entraîne une activité anti apoptotique avec une diminution du taux d'apoptose en présence de ligands de récepteur de mort tel que FasL. L'utilisation de staurosporine ou d'anticorps anti Fas induit une augmentation de l'apoptose uniquement en présence de l'interaction entre B7-H1 et PD-1.

Une modulation d'expression des molécules de costimulation à la surface des cellules a été décrite, selon l'exposition à différentes drogues. Au sein du laboratoire, nous avons retrouvé une augmentation de l'expression de CD86 et CD80 après incubation de la lignée DA1-3B avec de l'aracytine [120]. Sur des lignées de cancer du sein, l'équipe de Ghebeh a mis en évidence, une diminution de l'expression de B7-H1 à la surface des cellules, associée à une relocalisation nucléaire après exposition à la doxorubicine. Cette relocalisation s'accompagne aussi du passage d'AKT phosphorylé dans le noyau. L'utilisation de siRNA B7-H1 entraîne une augmentation d'apoptose après exposition à la doxorubicine. Celle-ci est encore augmentée par l'adjonction d'inhibiteur de PI3kinase/AKT. Cela a été démontré *in vitro* et *in vivo* [2]. L'expression de B7-H1 à la surface de la cellule module donc la réponse à la doxorubicine dans les cancers du sein. Il s'agit d'un premier lien entre immunorésistance et chimiorésistance. Toujours dans les cancers du sein (cette fois ci invasifs), l'équipe de Liu a démontré le rôle de B7-H3 dans la résistance au paclitaxel. La transfection de siRNA B7-H3 dans différentes lignées de cancer du sein a entraîné une augmentation de la sensibilité des cellules au paclitaxel, avec une diminution de l'activation de Stat3 et Jak2 et de leurs effecteurs : survivin et Mcl-1. Il existe bien une augmentation de la phosphorylation de Jak2 et Stat 3 en cas de réexpression de B7-H3 dans ces lignées. Les souris KO B7-H3 ont une croissance tumorale plus lente que les souris contrôles et elles ont une sensibilité au paclitaxel plus importante. La molécule B7-H3 induit donc une résistance au paclitaxel qui passe par l'activation de Jak2 et Stat 3 [253].

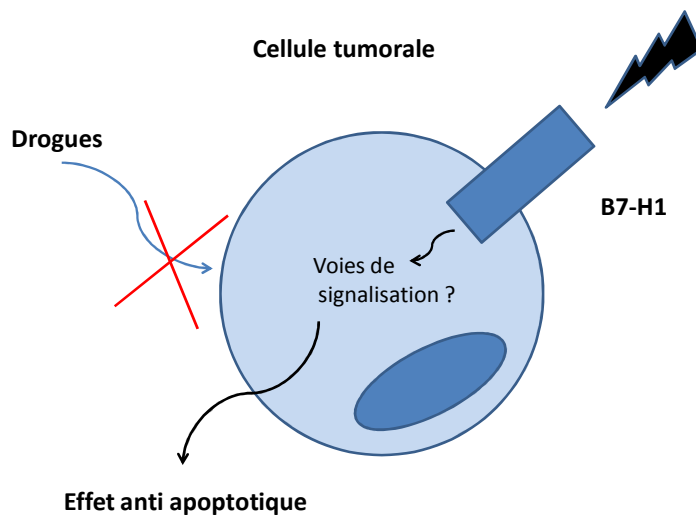
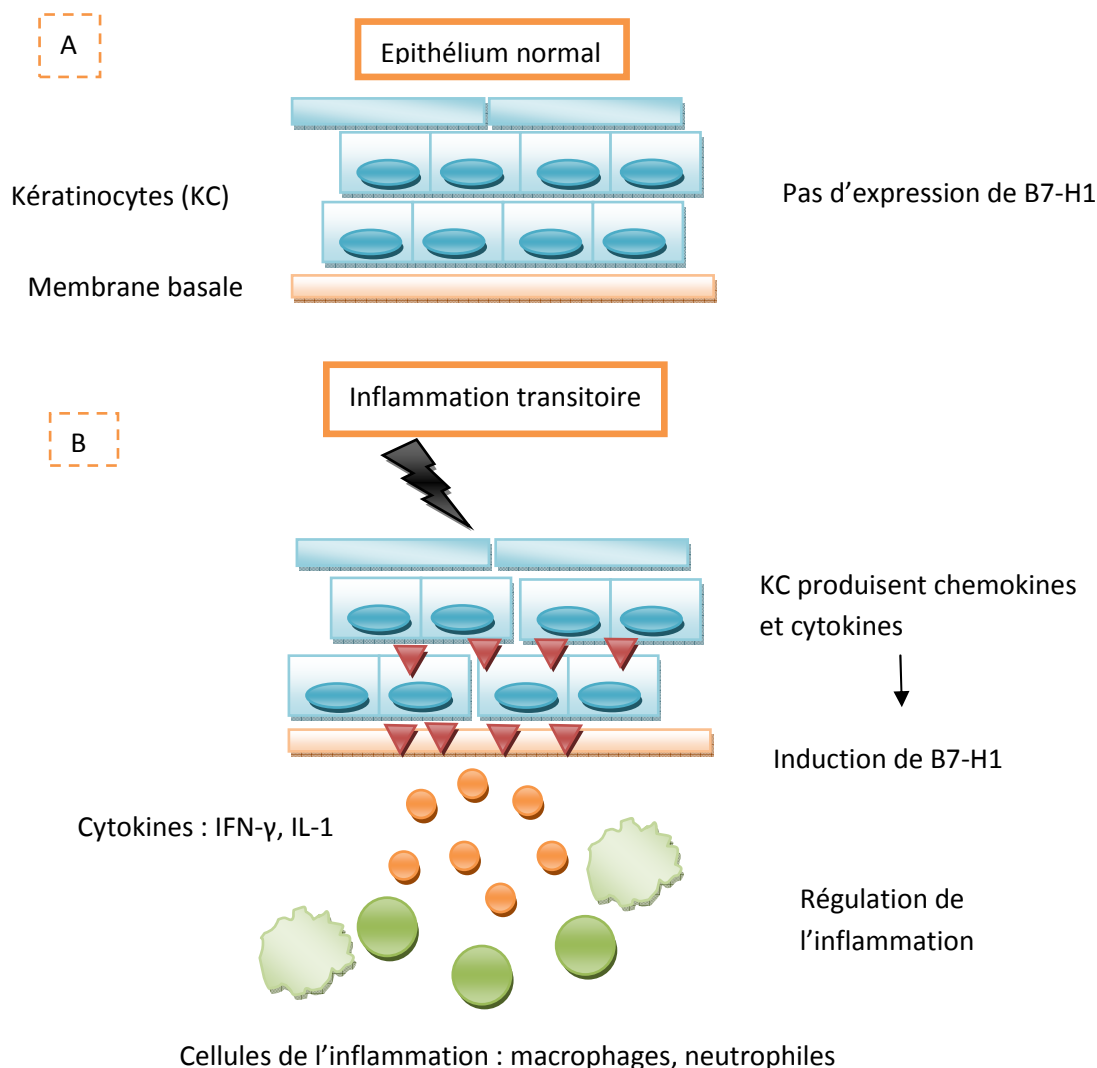


Figure N°20 : Hypothèse d'une fonction anti apoptotique de B7-H1 dans les cellules tumorales.

Une autre fonction non immunologique de B7-H1 est la participation au phénomène de transition épithélio-mésenchymateuse (MET). C'est le processus par lequel une cellule perd son phénotype épithélial afin de retrouver des caractéristiques de cellule mésenchymateuse, suite à différents stimuli. L'équipe de Cao a montré l'implication de la molécule B7-H1 dans ce processus de MET [254] (*Figure N°21*). Les auteurs sont tout d'abord partis d'une hypothèse qui s'est avérée fautive : l'expression de B7-H1 dans les kératinocytes (KC) peut protéger l'apparition de tumeurs cutanées. Dans un modèle de souris ayant une surexpression de B7-H1 au sein des KC, ils ont pu observer à l'inverse une augmentation de tumeurs cutanées après stimulation par méthylcholantrene (MCA). Le MCA entraîne une prolifération des KC avec production de molécules pro inflammatoires comme IL-1, IFN- γ , TNF- α , et l'IL-

6. Chez les souris au KC B7-H1 sur exprimé, ils ont retrouvé que l'IL-10, à l'action anti inflammatoire, était produite en plus grande quantité. Ils ont pu observer des modifications au niveau des cellules basales de l'épithélium liées à la surexpression de B7-H1, avec une perte d'alignement et une condensation de la chromatine de manière très rapide. Ils ont retrouvé une apparition très précoce de tumeurs cutanées de petite taille sans infiltration par les lymphocytes T et une mort des souris plus précoce. B7-H1 accélère donc la formation de tumeurs. Les auteurs ont montré que la surexpression de B7-H1 dans les KC régule le phénomène EMT (augmentation des facteurs de transcription comme Slug et Twist qui favorisent EMT) et favorise la carcinogénèse en diminuant l'expression de E cadherine. Ce mécanisme semble indépendant du récepteur PD-1 et les voies de signalisation impliquées dans ce phénomène n'ont pas été retrouvées par les auteurs.



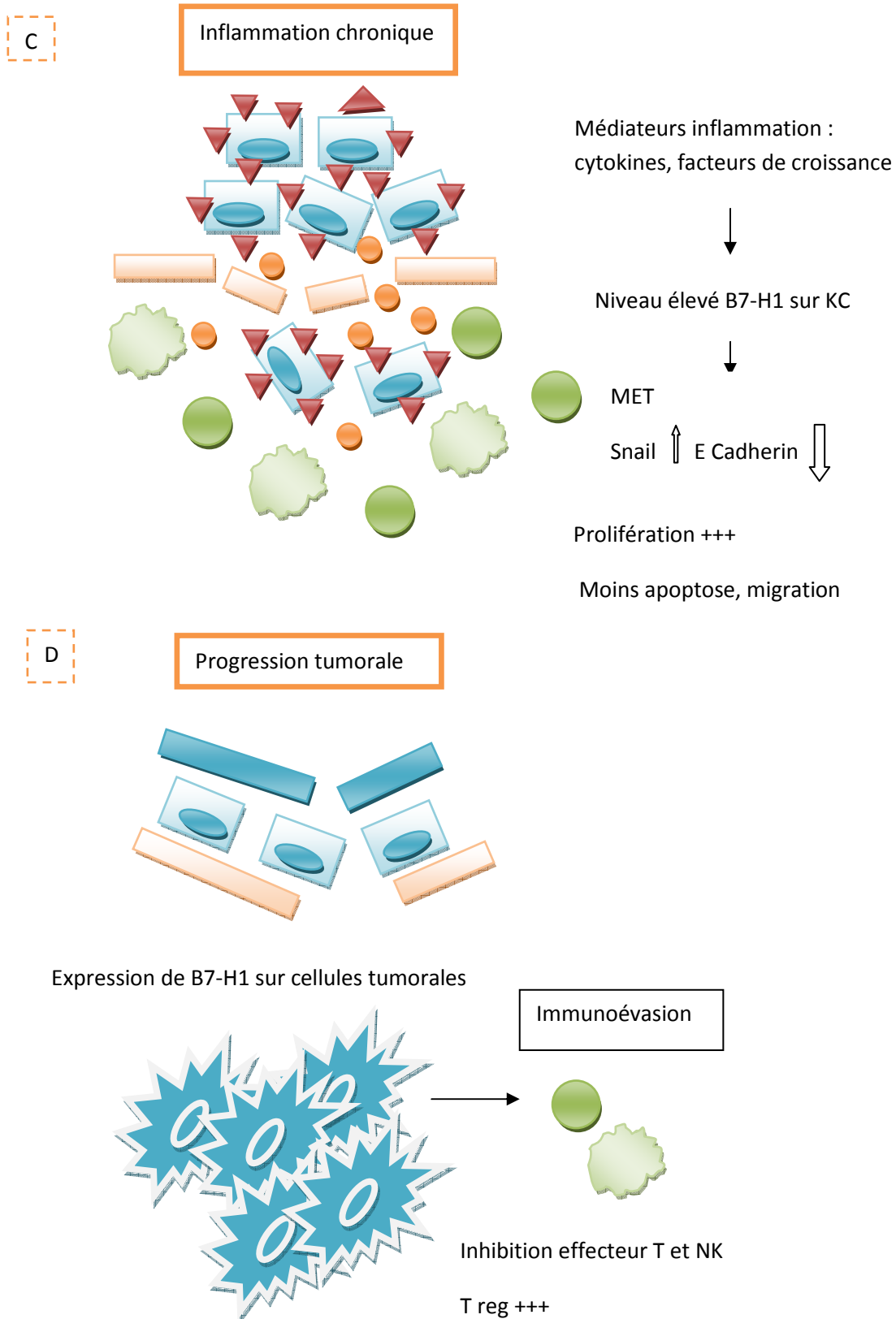


Figure N°21 : Proposition d'implication de la molécule B7-H1 dans la progression tumorale. A et B dans la peau normale B7-H1 est exprimé uniquement après des signaux d'inflammation, il joue un rôle dans la régulation de l'inflammation. C : l'inflammation chronique entraîne une expression forte de B7-H1 qui est impliqué dans les mécanismes de MET. D : Dans la phase de progression tumorale B7-H1 va permettre l'échappement tumoral [254].

IV. IDO

a. Généralités

Le tryptophane est un acide aminé essentiel pour la synthèse des protéines et la production de NAD (nicotinamide acide dinucleotide) et de la sérotonine. Le pool de tryptophane non utilisé par l'organisme est détruit par le foie. Depuis 1970, plusieurs études ont montré qu'il existait deux types d'enzymes capables de métaboliser le tryptophane. Tout d'abord, la TDO (tryptophan 2,3-dioxygenase) surtout exprimée au niveau des cellules hépatiques avec une grande spécificité pour le tryptophane, et également l'IDO (Indoleamine 2,3 dioxygenase) qui est exprimée dans de nombreux tissus et stimulée par des protéines inflammatoires et moins spécifiques pour son substrat.

Le gène qui code pour cette protéine INDO (ou IDO) est situé sur le chromosome 8. Il comporte 10 exons. L'activation de l'IDO est possible par l'intermédiaire de virus, de bactéries via le LPS et l'IFN- γ tandis que l'activité TDO est stimulée par le tryptophane, la tyrosine, l'histidine, les glucocorticoïdes et la kynurénine.

Depuis quelques années a été mise en évidence une protéine IDO2 codé par le gène INDOL1 situé à proximité du gène INDO [255]. Cette protéine est plus longue et s'exprime de manière préférentielle sur les cellules dendritiques, au contraire de l'IDO [256-258]. L'IDO est inhibée par le L-1méthyltryptophane et l'IDO2 par le D-méthyltryptophane [255].

L'IDO est retrouvée sur de nombreux tissus [258]. Cette enzyme permet le clivage du noyau pyrrole de tryptophane par l'insertion d'une molécule d'oxygène ce qui produit le N-formyl-kynurénine qui est ensuite hydrolysé en kynurénine. La kynurénine va ensuite donner différents métabolites comme la 3OH kynurénine, l'acide anthranilyque et le 3OH acide anthranilyque (*Figure N°21*).

L'IDO est une enzyme de type oxydoréductase possédant un noyau hémique. De nombreux stimulants induisent la production de cette enzyme. Le principal est l'IFN- γ , interviennent également le LPS, l'IL-1, le TNF- α ou la liaison avec les molécules B7 via CTLA-4 [259-261]. Les voies de signalisation impliquées dans cette stimulation sont principalement JAK-STAT et NF-kB [262-263].

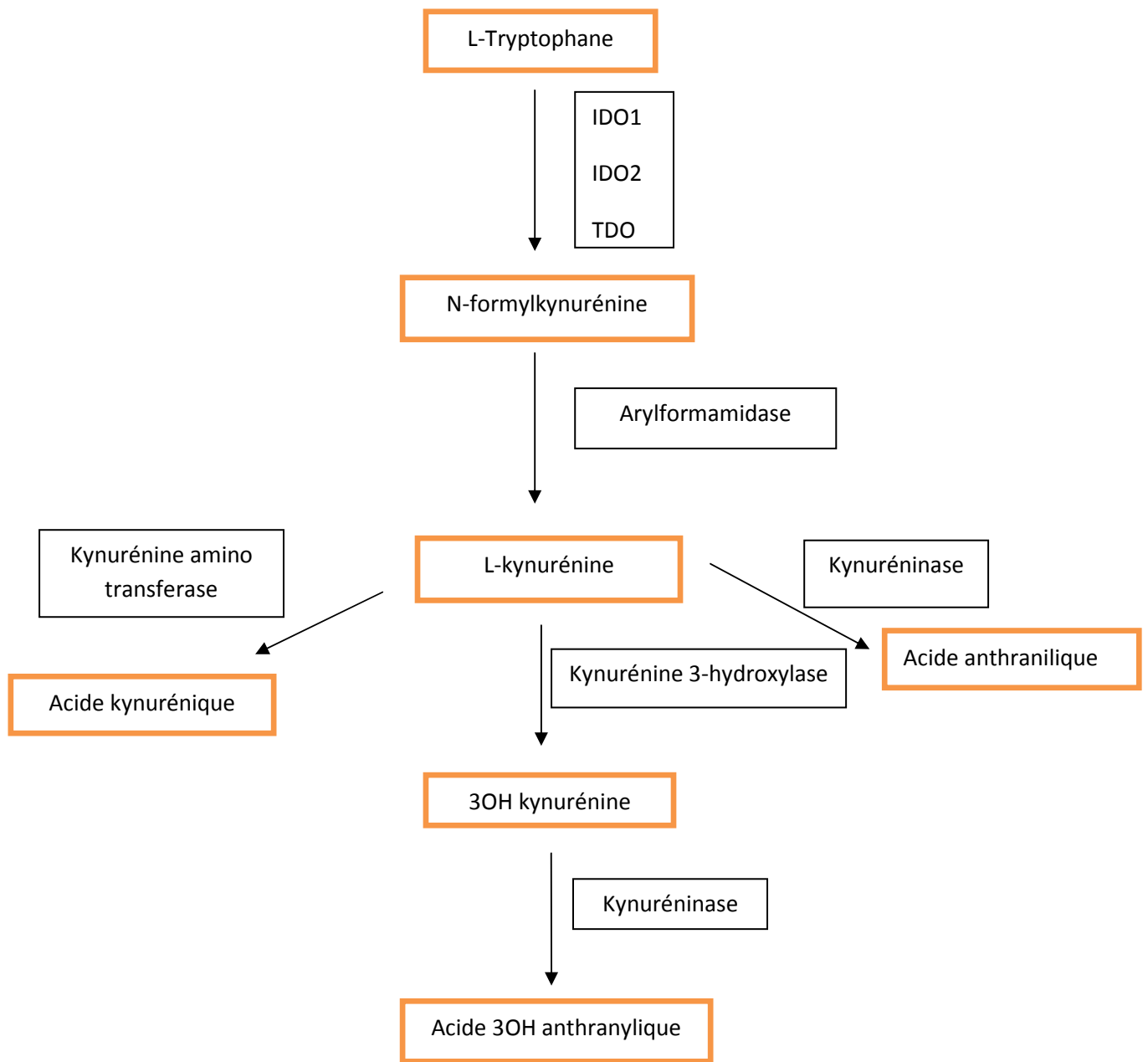


Figure N°22 : Les différents métabolites de la kynurénine.

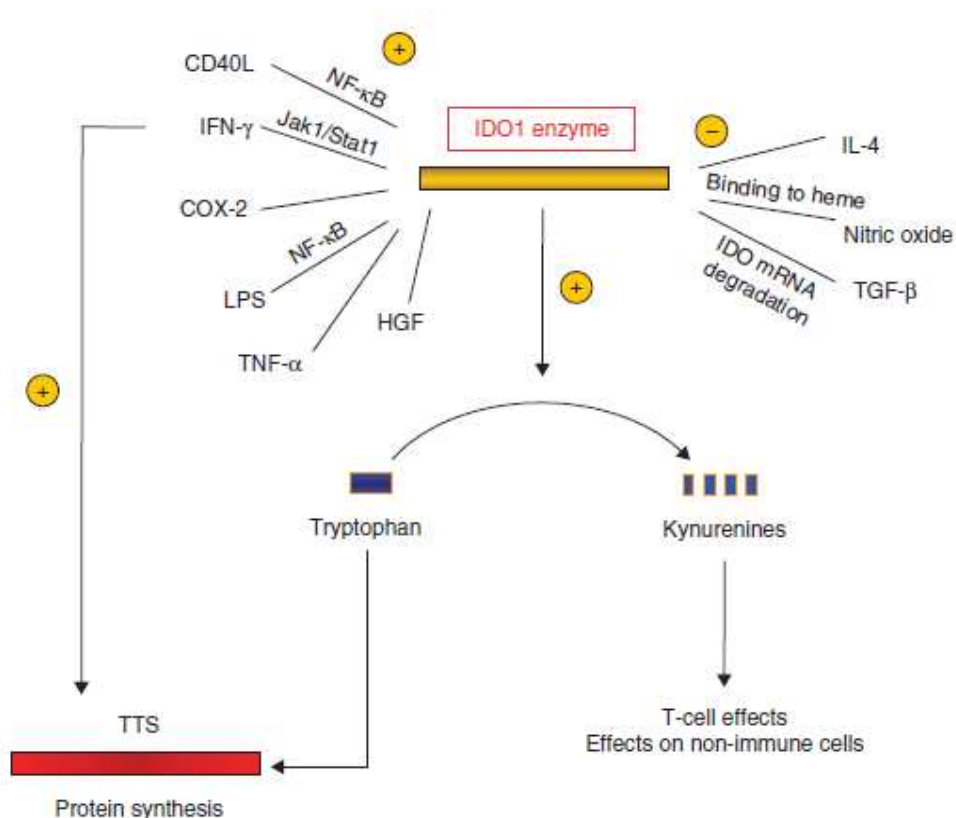


Figure N°23 : Régulation de l'activation de l'IDO [256].

Le rôle de l'IDO a tout d'abord été mis en évidence pendant la grossesse dans la tolérance materno-fœtale [264]. Il existe 2 hypothèses sur la fonction régulatrice immunitaire. Tout d'abord on observe qu'une déplétion en tryptophane dans les tissus ou le milieu de culture réduit la prolifération et augmente l'apoptose des lymphocytes T. Récemment a été montré que l'augmentation de l'apoptose des lymphocytes T était liée à l'augmentation des métabolites du tryptophane tel que la kynurénine [265-267]. Le deuxième élément est la conversion de cellules CD25⁻ Foxp3⁻ en lymphocytes T reg via le catabolisme du tryptophane [268]. L'IDO est impliquée dans de nombreuses pathologies : infectieuses, auto-immunes, tumorales.

De nombreuses études ont montré que l'IDO participait à l'inhibition d'infections virales ou de germes intracellulaires comme la toxoplasmose ou les chlamydiae [269-270]. Après stimulation par l'IFN, les cellules dendritiques expriment de l'IDO et ainsi induisent l'élimination du pathogène. L'IDO joue également un rôle dans les infections fongiques à candida ou aspergillus [271-272].

Dans les modèles d'auto-immunité expérimentale telle que l'EAE (autoimmune encéphalomyélite) l'IDO permet de passer d'une réponse Th1 en réponse Th2 et de cette manière atténuer les dommages tissulaires et l'inflammation. L'introduction de tryptophane oral dans ce modèle animal permet aux souris malades déficitaires neurologiquement de récupérer une certaine mobilité. Chez les patients présentant un rhumatisme articulaire, on a montré que les cellules dendritiques intra articulaires exprimaient l'IDO ce qui permettait l'inhibition de la prolifération de lymphocytes T intra articulaires [273]. L'IDO est donc un rétro contrôle négatif sur l'immunité cellulaire dans les pathologies inflammatoires.

L'IDO est aussi impliquée dans les phénomènes de tolérance immunitaire dans les greffes d'organes ou de moelle osseuse, il a des propriétés anti rejet démontrées in vitro et in vivo [274-275]. De nombreux auteurs démontrent l'implication de différents agents immunosuppresseurs comme CTLA-4 Ig ou CD40 Ig qui permettent une tolérance [276]. Ces agents entraînent une activation de l'IDO sur les cellules dendritiques et endothéliales, et donc une augmentation des T reg [276-277]. Dans un modèle murin d'allogreffe de moelle les souris KO pour l'IDO ont une incidence plus importante de GVH digestive et une diminution de leur survie [278]. On observe alors une augmentation de la prolifération de lymphocytes T CD4⁺ CD8⁺.

De nombreuses cellules tumorales expriment de l'IDO [67] et la transfection d'IDO dans les cellules tumorales prévient le rejet chez les hôtes pré immunisés [279]. Le blocage de l'IDO a un effet anti tumoral uniquement chez des hôtes immunocompétents : l'IDO module donc la réponse immunitaire anti tumorale. L'IDO a une fonction au niveau du site tumoral. La déplétion en tryptophane et la production des différents métabolites qui s'y produit va entraîner une diminution de l'expansion clonale de lymphocytes T effecteurs et donc diminuer leur survie. Chez les patients la surexpression de l'IDO au niveau des cellules tumorales est un facteur de mauvais pronostic, cela a été démontré pour les carcinomes ovariens, les carcinomes de l'endomètre et les cancers colorectaux [280-281].

b. IDO et LAM

En ce qui concerne les hémopathies, plusieurs travaux ont été réalisés sur l'IDO, dont un réalisé par notre équipe dans les leucémies aiguës myéloïdes.

Munn en 2004, a pu d'abord démontrer que les blastes des LAM expriment l'IDO, ce qui n'est pas le cas pour les progéniteurs myéloïdes CD34⁺. Il a également montré que cette enzyme est active : cela sous entend que l'expression constitutive de la protéine IDO est en lien avec la leucémogénèse [282].

Tous les blastes de LAM n'expriment pas cette protéine IDO. Il existe une corrélation entre le niveau ARNm et le taux de protéines détecté par méthode enzymatique [67]. Notre équipe a pu mettre en évidence l'activité de cette enzyme par des dosages avec une méthode de type HPLC (high-performance liquid chromatography) des différents métabolites et son inductibilité par l'IFN- γ [283].

L'équipe de Chamuleau a montré qu'une forte expression d'IDO à la surface des blastes induisait, pour le patient, une diminution de sa survie globale et de sa survie sans rechute. Cette forte expression d'IDO constitue un facteur pronostique défavorable [284]. Dans les hémopathies malignes tels que les lymphomes non hodgkiniens, la maladie de hodgkin, la leucémie lymphoïde chronique et les syndromes myélodysplasiques, il a été montré une augmentation du taux de T reg circulants [285-286]. Curti a montré que les blastes de LAM peuvent induire des T reg CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ à partir de cellules T Foxp3⁻ CD25⁻ grâce à l'expression de l'IDO et du métabolisme du tryptophane [287]. Pour le moment les mécanismes par lesquels se fait la modulation des cellules T par les blastes de LAM exprimant l'IDO ne sont pas encore élucidés.

L'IDO pourrait donc devenir une nouvelle cible thérapeutique dans la prise en charge des cancers. Plusieurs études pré cliniques ont montré l'intérêt des inhibiteurs de l'IDO dans les tumeurs murines. Les petites molécules comme 1 méthyl-tryptophane (1-MT) permettent une diminution de croissance des tumeurs mais pas leur élimination [288]. En revanche la combinaison d'un inhibiteur de l'IDO et des cytotoxiques permet la diminution de taille des tumeurs.

CHAPITRE 2

RESULTATS

Première partie :

Etude de l'expression de la molécule B7-H1 sur les blastes de LAM et fonction immunologique sur les lymphocytes T cytotoxiques.

Cancer Immunol Immunother (2010) 59:1839–1849
DOI 10.1007/s00262-010-0909-y

ORIGINAL ARTICLE

In acute myeloid leukemia, B7-H1 (PD-L1) protection of blasts from cytotoxic T cells is induced by TLR ligands and interferon-gamma and can be reversed using MEK inhibitors

Céline Berthon · Virginie Driss · Jizhong Liu ·
Klaudia Kuranda · Xavier Leleu · Nathalie Jouy ·
Dominique Hetuin · Bruno Quesnel

La molécule B7-H1 participe à l'immunoévasion dans de nombreuses tumeurs. Son expression est régulée par de nombreux stimuli. Nous nous sommes intéressés à une série de 79 patients présentant une LAM (au diagnostic ou en rechute) ainsi qu'à différentes lignées cellulaires leucémiques murines et humaines.

Nous avons évalué tout d'abord l'expression basale de B7-H1 et son inductibilité par différents ligands ainsi que l'expression des TLR 2, 4 et 9 sur les blastes et enfin les conséquences immunologiques de cette expression.

L'expression de B7-H1 sur les LAM se retrouve chez 18% des patients et l'expression des TLR 2, 4 et 9 est retrouvée dans 1/3 des patients. Il n'existe pas de corrélation clinico biologique de B7-H1 avec le type FAB, la leucocytose et le caryotype. La stimulation des TLR 2 et 4 par leur ligand respectif (PGN et LPS) et l'IFN- γ entraîne une augmentation d'expression de B7-H1 et une augmentation de la protection contre la lyse par les lymphocytes T cytotoxiques. L'étude des différentes voies de signalisation a permis de mettre en évidence l'implication de la voie MEK. En utilisant un inhibiteur de MEK (UO126 et AZD6244) on retrouve une diminution de l'expression de B7-H1 sur les blastes avec une augmentation de la lyse par les CTL.

B7-H1 est potentiellement un mécanisme d'immunoévasion pour les LAM. L'inductibilité de B7-H1 par l'IFN- γ et les ligands des TLR suggère que différents stimuli survenant au cours de la réponse anti tumorale ou dans un contexte infectieux peuvent protéger ces blastes de la lyse par les CTL. L'efficacité des inhibiteurs de MEK sur l'expression de B7-H1 offre une nouvelle stratégie thérapeutique dans la prise en charge des LAM.

Deuxième partie:

Implication de la molécule B7-H1 dans la résistance aux chimiothérapies (*Résultats provisoires*)

Introduction

L'implication de la molécule B7-H1 dans des phénomènes immunologiques n'est plus à démontrer ce jour. Récemment, différentes équipes ont pu mettre en évidence d'autres fonctions non immunologiques des molécules de la famille B7 : une fonction anti apoptotique directe, une augmentation de la résistance aux chimiothérapies et une implication dans le processus de transition épithélio-mésenchymateux [254].

L'équipe de Ghebeh a permis de montrer une augmentation de la sensibilité à la doxorubicine après utilisation de siRNA B7-H1 sur des lignées et des cellules humaines de cancer du sein [2].

La seconde partie de ce travail a donc essayé d'évaluer l'implication de la molécule B7-H1 dans la résistance à différentes chimiothérapies sur une lignée de cellules murines leucémique (DA1.3B). Pour cela notre travail a été construit au tour de la mise en place d'un système inductible (IPTG) afin de moduler le niveau d'expression de B7-H1 dans les DA1.3B. Ensuite différentes chimiothérapies ont été testées : daunorubicine, aracytine, idarubicine, mitoxantrone, clofarabine, cladribine, étoposide et amsacrine.

Une autre partie a été de rechercher si les liaisons B7-H1 et B7.1 ou B7-H1 et PD-1 modulaient aussi la réponse à la chimiothérapie.

Une troisième partie encore en cours, a été l'utilisation de ce système inductible in vivo. Les souris ont tout d'abord reçu des DA1-3B B7-H1 par voie intra péritonéale puis plus ou moins de l'IPTG avec ensuite un traitement par aracytine en sous cutané afin d'évaluer l'influence de l'expression de B7-H1 sur la survie.

Matériel et méthodes :

Lignées cellulaires et transfections

Les DA1-3B et les transfectants stables sont cultivés dans du DMEM comportant 10% de sérum de veau foetal, L-Glutamine 100U/ml pénicilline et streptomycine à 37°C dans 5% de CO₂.

Toutes les transfections sont faites sur les cellules DA1-3B par électroporation. On utilise le système Amaxa (Koeln, Germany) avec la solution V et le programme O-17.

Un système de transfection avec système inductible (*Figure N°24*) a été utilisé, il consiste tout d'abord avec une première transfection du plasmide répresseur qui contient un gène de résistance à l'hygromycine. Après cette première transfection, une sélection par l'hygromycine est réalisée puis une deuxième transfection avec un deuxième plasmide qui contient le gène d'intérêt : B7-H1 et un gène de résistance à la puromycine. Une deuxième sélection avec la puromycine a permis d'obtenir des transfectants stables et secondairement une dilution limite a pu être réalisée, permettant l'obtention d'une dizaine de clones. Leur inductibilité en B7-H1 par l'IPTG a été testé par cytométrie en flux après 48 heures d'incubation avec l'IPTG.

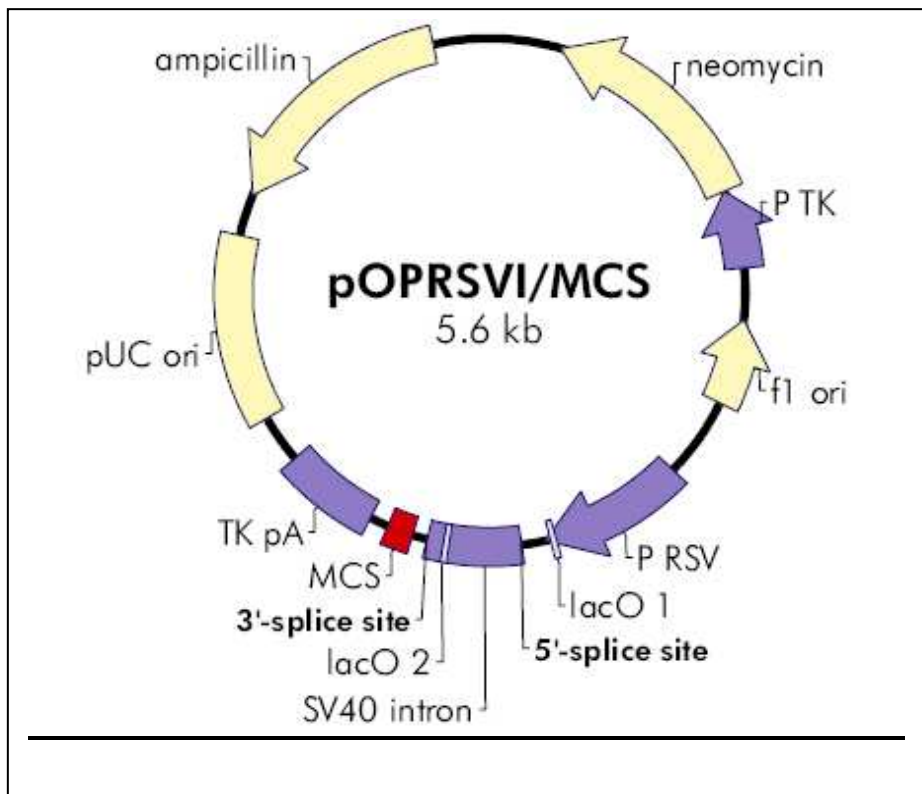
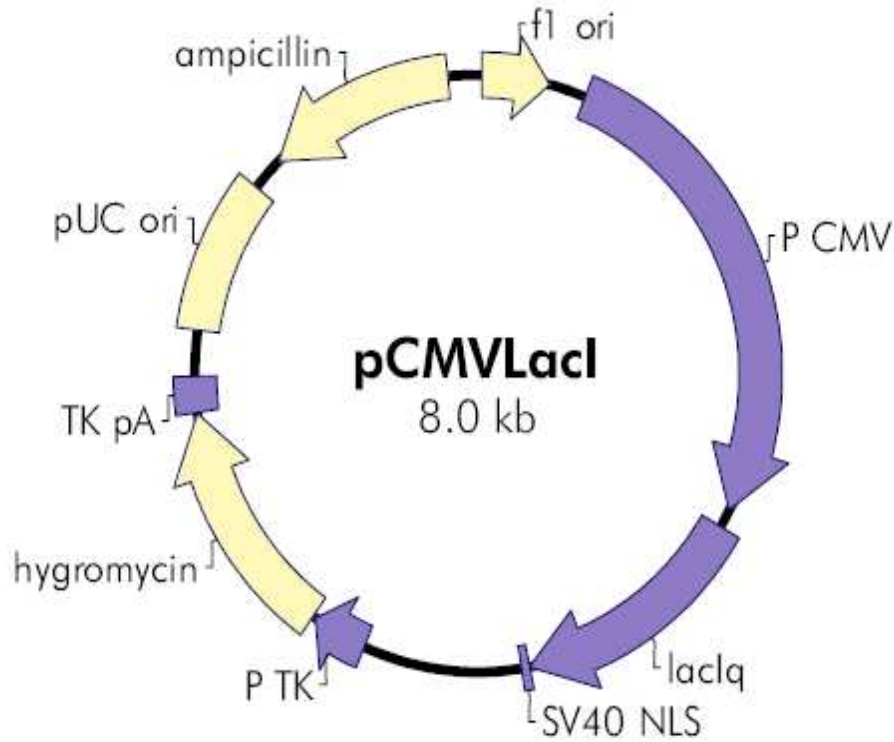


Figure N°24 : Système inductible IPTG. A plasmide répresseur comprenant le promoteur Lac ayant un taux de transcription très élevé en présence de lactose ou d'isopropylthiogalactoside (IPTG). B plasmide d'intérêt avec B7-H1

Cytométrie en flux

L'expression de B7-H1 est évaluée par cytométrie en flux sur la lignée DA1-3B B7-H1 après 48 heures de stimulation par l'IPTG avec l'anticorps B7-H1-PE (clone MIH1).

MTT

Les cellules DA1-3B B7-H1 sont mises en culture en présence ou absence d'IPTG (1U/ml) pendant 48 heures puis ensuite les cellules sont réparties en plaques de 96 puits avec les différentes chimiothérapies avec une gamme de concentration (data ci-dessous) pendant 72 h, le test MTT est ensuite réalisé avec calcul des IC50 pour chaque drogue.

Coatage de plaques

Des plaques 96 puits sont « coatées » avec soit la molécule soluble B7.1, soit PD-1, soit un isotype contrôle. La protéine est déposée pendant 48h à 4°C sur les plaques avant d'être lavée. Les cellules DA1-3B sont ensuite mises dans ces plaques coatées avec les différentes drogues (gamme de concentration) (*Figure N° 25*). Le test MTT est réalisé après 72 heures d'incubation à 37°C avec les drogues testées.

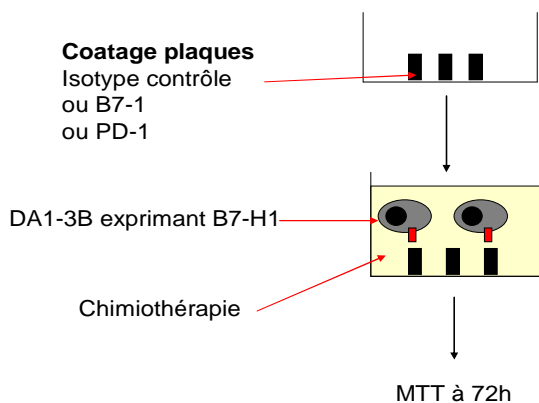


Figure N°25 : Coatage de plaques.

Drogues

Amsacrine	Mitoxantrone	Clofarabine	Etoposide	Daunorubicine	Cladribine	Aracytine	Idarubicine
[c] µg/ml	[c] µg/ml	[c] µg/ml	[c] µg/ml	[c] µg/ml	[c] µg/ml	[c] µg/ml	[c] µg/ml
0,00610352	0,001024	0,0000095	0,01024	0,000042	2E-05	0,0025	0,000026
0,02441406	0,00512	0,000076	0,0512	0,000214	0,0001	0,01	0,00013
0,09765625	0,0256	0,00061	0,256	0,001066	0,0010	0,156	0,00064
0,390625	0,128	0,00488	1,28	0,005334	0,0081	0,39	0,0032
1,5625	0,64	0,03906	6,4	0,026672	0,0651	0,625	0,016
6,25	3,2	0,3125	32	0,13336	0,5208	2,5	0,08
25	16	2,5	160	0,6668	4,167	10	0,4
100	80	20	800	3,334	33,33	40	2

Modèle in vivo

Une série de 60 souris C3H a été injecté avec 10^5 cellules DA1.3b B7-H1 IPTG par souris en intra péritonéal puis 11 jours après cette injection la moitié des souris ont reçu de l'IPTG par voie orale. Dans chaque groupe, la moitié des souris sont ensuite traitées par de l'aracytine en sous cutané à la dose de 100 mg/Kg /J pendant 3 jours consécutifs à 16 jours de la première injection (*Figure N°26*).

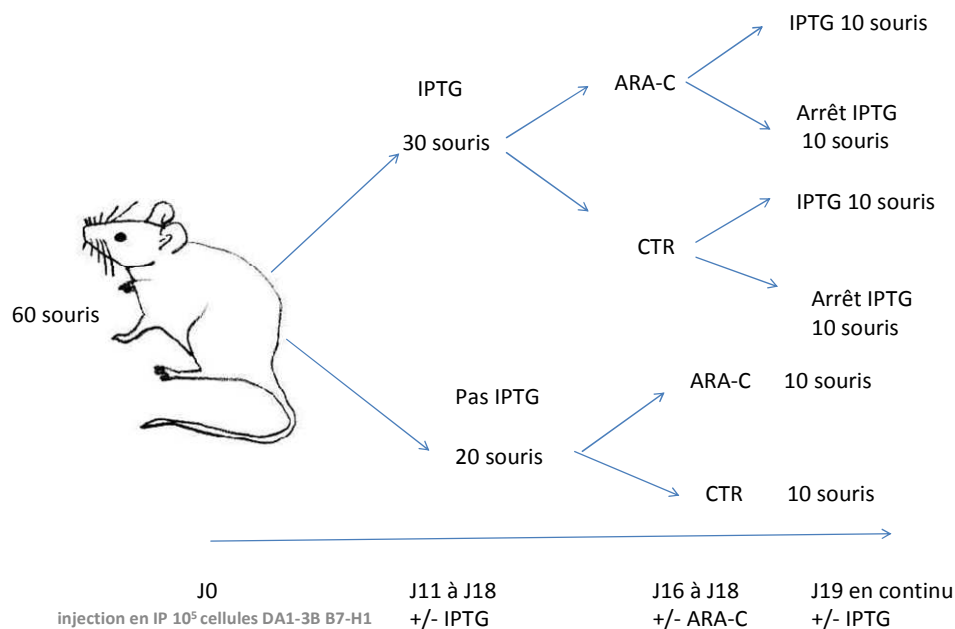


Figure N°26 : Modèle in vivo

Résultats

Implication de la molécule B7-H1 dans la résistance aux drogues

Les DA1.3B ont été transfectées avec le système inductible IPTG permettant d'obtenir 10 clones stables. Les 3 clones qui avaient la meilleure inductibilité par l'IPTG en cytométrie de flux ont été sélectionnés pour la suite des expériences (*Figure N°27*). Les cellules DA1.3B B7-H1 IPTG ont été mise en culture pendant 48 heures avec de l'IPTG puis ensuite pendant 3 jours avec les différentes drogues à différentes concentrations (*Figure N° 28*). Il existe une augmentation d'IC50 pour plusieurs drogues après augmentation d'expression de B7-H1 avec des profils de résistance aux drogues différents selon les clones testés. Ces résultats restent à confirmer.

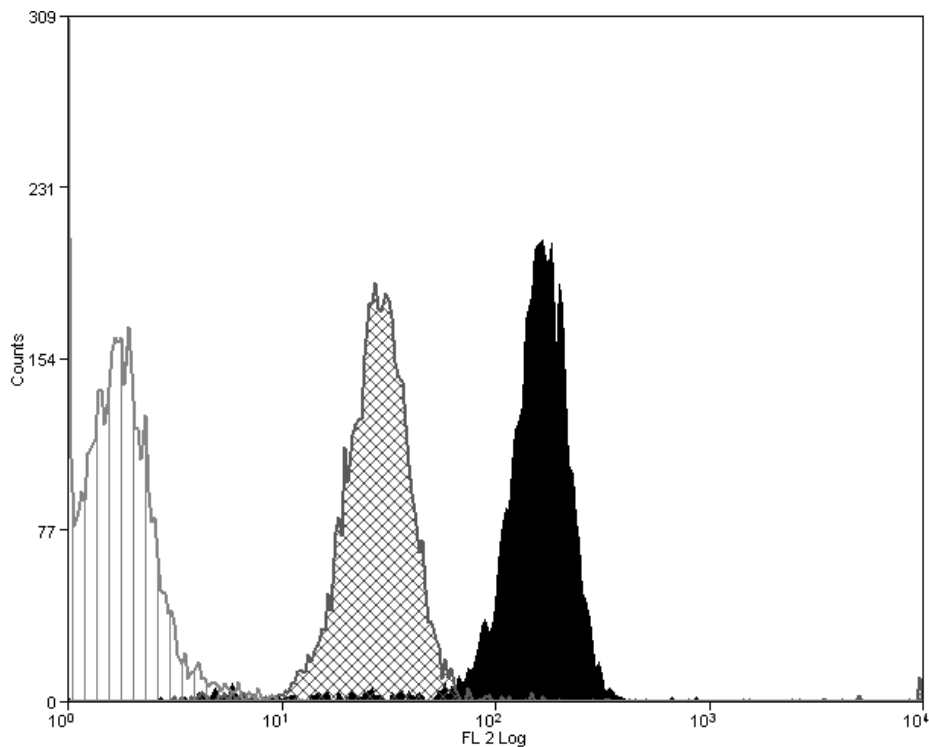


Figure N°27 : Inductibilité des clones B7-H1. Isotype (rayure grise). Expression basale de B7-H1 (en grisé) et après 48h d'induction par l'IPTG (en noir) sur les cellules DA1-3b B7-H1.

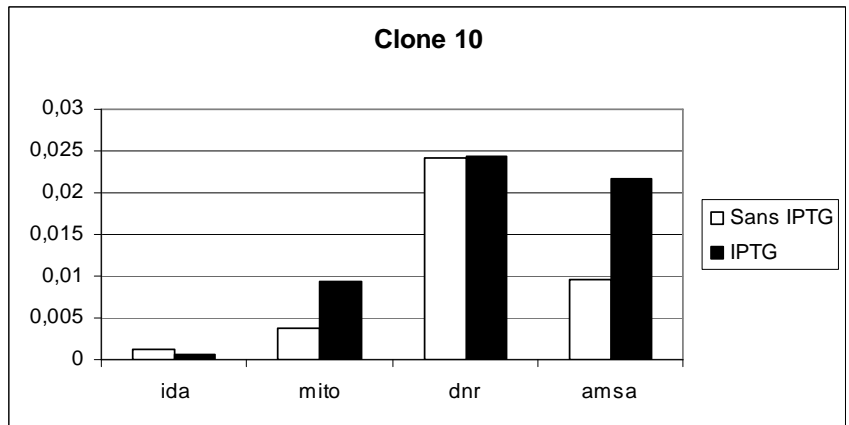
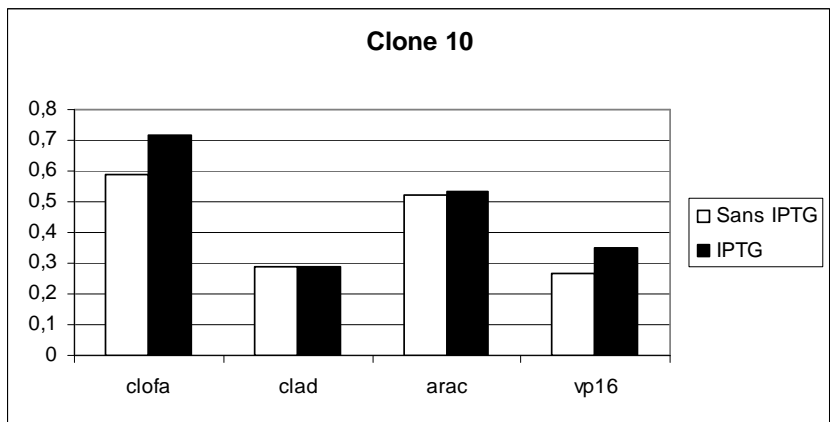
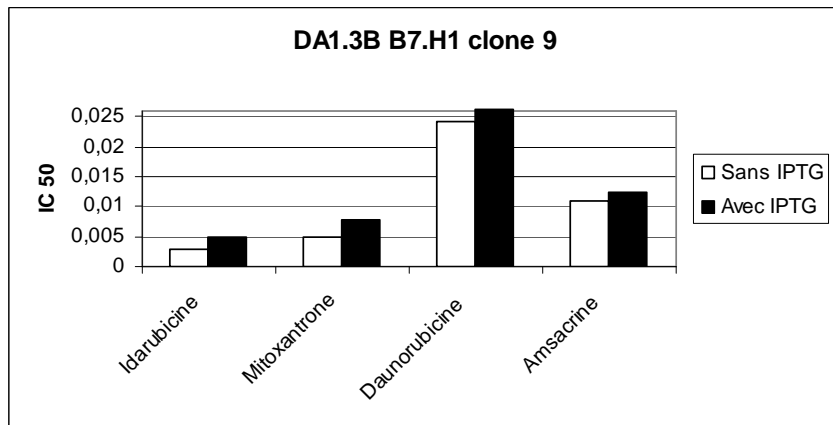
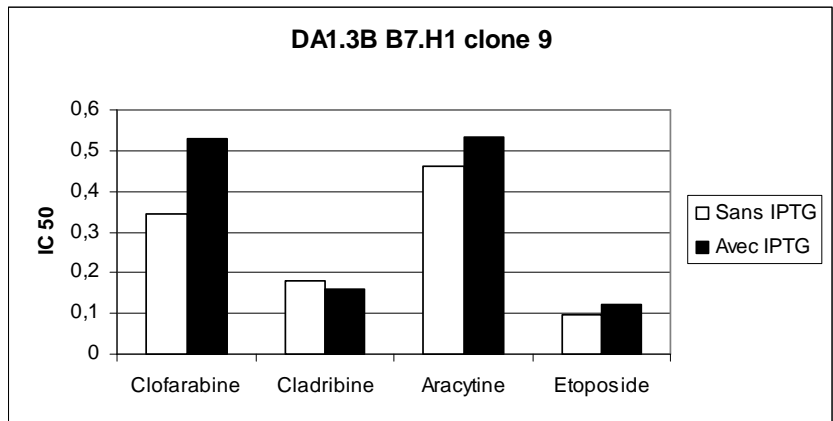


Figure N°28 : Tests MTT sur les différents clones de DA1.3B B7-H1.

Implication de la liaison B7-H1 / B7.1 dans la résistance aux drogues

Afin de regarder si la liaison de B7-H1/B7.1 ou B7-H1/PD-1 influence la résistance aux drogues, les protéines solubles (PD-1 ou B7-H1 ou Isotype contrôle) ont été fixées sur des plaques 96 puits avec analyse MTT au bout de 72 heures de traitement par Idarubicine, Staurosporine ou Gleevec. La liaison entre B7-H1 et PD-1 ou B7-H1 et B7.1 semble augmenter la survie des cellules.

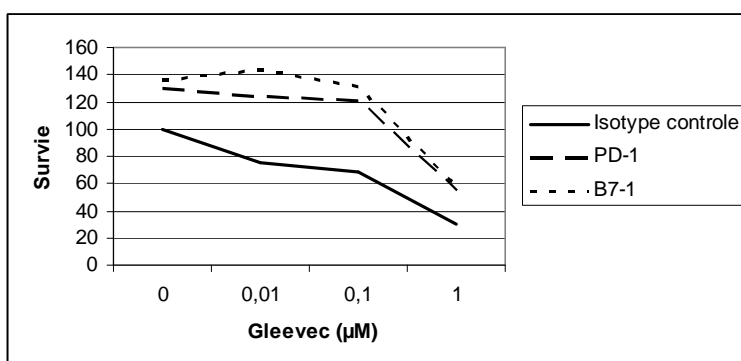
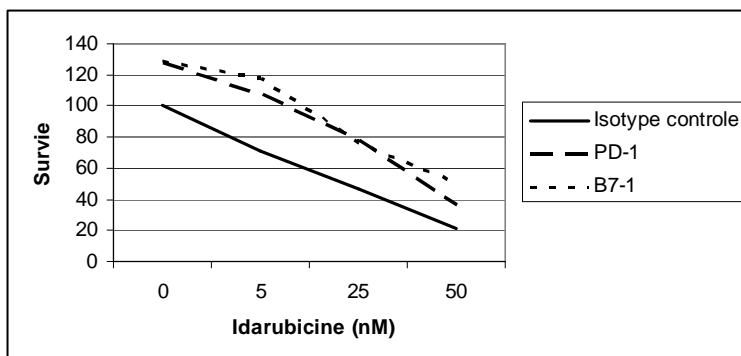
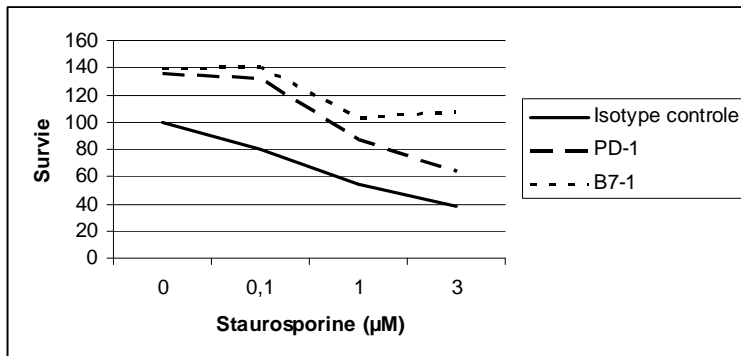


Figure N°29 : Interaction de B7-H1 et PD-1 et B7-H1 et B7.1

Implication de la modulation de B7-H1 in vivo sur la réponse à l'aracytine, données préliminaires

Afin d'évaluer l'impact in vivo de la surexpression de B7-H1 sur la croissance tumorale et la réponse à l'aracytine, une série de 60 souris ont été injecté avec 10^5 cellules DA1-3b B7-H1. La moitié des souris ont reçu de l'IPTG de J11 à J18 puis plus ou moins de l'aracytine. La croissance tumorale semble plus importante dans le groupe recevant de l'IPTG. Ces données nécessitent un follow-up plus long et une répétition de l'expérimentation à des doses de cellules DA1-3b, plus élevées. Il semble en fait que l'expression de B7-H1 soit indispensable à la tumorigénicité de cette lignée, tout du moins pour une dose de cellules de 10^5 cellules DA1-3B B7-H1 non induites. L'inductibilité de B7-H1 par l'IPTG semble annuler l'effet de la chimiothérapie (*Figure N°30*).

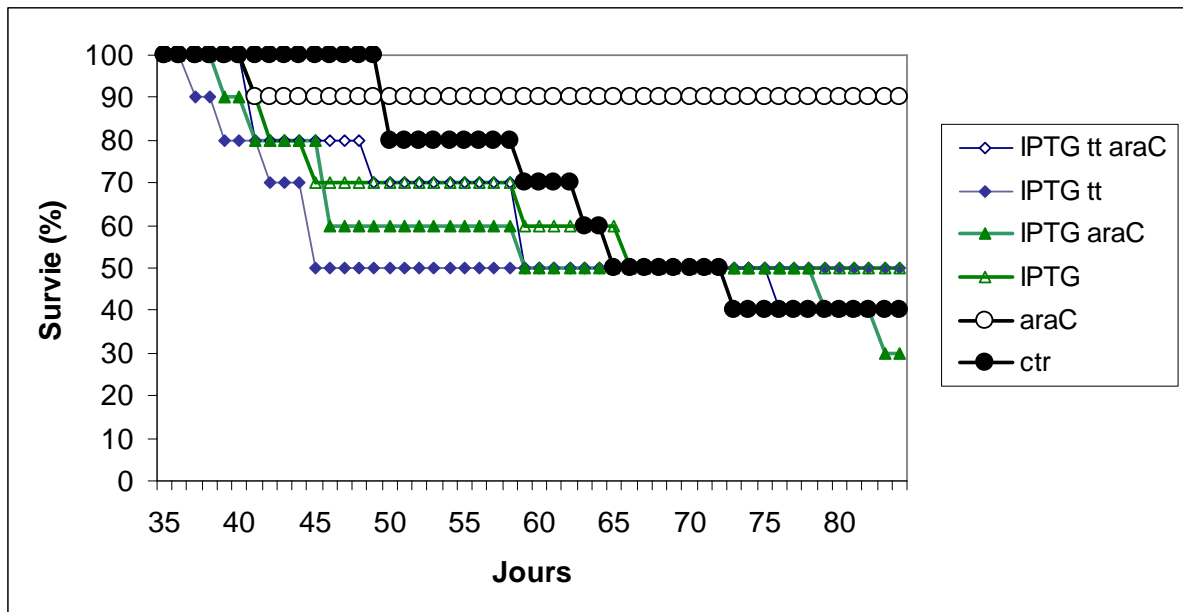


Figure N°30 : Résultats du modèle in vivo. 60 souris C3H ont été injectées avec 10^5 cellules DA1-3b B7-H1(J1) Ensuite elles ont été séparées en 6 groupes de 10 souris. Le groupe contrôle n'a rien reçu de plus. Le groupe araC a reçu uniquement de l'aracytine à la dose de 100mg/kg/J pendant 3 jours en sous cutané de J16 à J18. Le groupe IPTG a reçu uniquement de l'IPTG par voie orale de J11 à J18. Le groupe IPTG araC a reçu de l'IPTG (même voie administration) de J11 à J18 et de l'aracytine (même posologie dans différents groupes) de J16 à J18. Le groupe IPTG tt a reçu uniquement de l'IPTG en continu de J11 à J66. Le groupe IPTG tt araC a reçu de l'IPTG en continu de J11 à J66 et de l'aracytine de J16 à J18 (idem posologie. (cf figure N°26).

Discussion

Le rôle immunologique des molécules de costimulation est largement démontré mais récemment d'autres fonctions ont été mises en évidence. L'équipe De Ghebeh a mis en évidence une augmentation de la sensibilité des cellules tumorales de cancer du sein à l'administration de doxorubicine après utilisation de si RNA B7-H1. Il existe une relocalisation de B7-H1 en intra cellulaire dans les cancers du sein après administration de doxorubicine. Ceci est accompagné d'une relocalisation d'AKT phosphorylé au sein du noyau. L'administration de siRNA B7-H1 entraîne une augmentation d'apoptose après exposition à la doxorubicine [2].

Une autre équipe a mis en évidence l'implication de B7-H3 dans les mécanismes de résistance au paclitaxel dans les cancers du sein. L'utilisation de si RNA B7-H3 augmente l'activité Jak2 et Stat 3 avec une augmentation de la sensibilité au paclitaxel. Les souris KO B7-H3 ont une croissance tumorale plus lente et une sensibilité plus importante au paclitaxel [253].

Les résultats préliminaires que nous avons obtenus avec les lignées DA1-3b B7-H1 inducible sont en faveur d'une modulation de la réponse aux drogues en fonction des différents clones. B7-H1 pourrait peut être jouer un rôle anti apoptotique dans les LAM. Ces résultats sont à confirmer par des expériences complémentaires identifiant notamment les modifications de signalisation intracellulaires induites par l'expression, et l'interaction de B7-H1 avec PD-1 et/ou B7.1.

Les premiers résultats qui restent à confirmer de l'expérience in vivo sont en faveur d'un rôle essentiel de B7-H1 dans la prolifération tumorale. Les souris traitées par IPTG semblent développer plus de leucémies et mourir plus rapidement. Il est encore trop tôt pour conclure, notamment pour dissocier les effets immunologiques d'effets non immunologiques, notamment sur la résistance à la cytarabine. En effet, la faible expression de base de B7-H1 dans les cellules non exposées à l'IPTG semble réduire considérablement la leucémogénicité des cellules par rapport à la lignée mère DA1-3b, il est donc difficile pour le moment d'évaluer l'impact in vivo sur la chimiosensibilité. Ces résultats sont à confirmer par des expériences supplémentaires, en accoisant le nombre de cellules injectées pour tenir compte de la perte de la leucémogénicité de base, et en reproduisant l'expérimentation dans des souches de souris immunodéficientes Nude, SCID, NOD-SCID, et NSG afin de dissocier précisément les effets non immunologiques.

La découverte de l'interaction entre B7-H1 et B7.1 par l'équipe de Butte, entraîne à repenser les interactions des cellules tumorales et des cellules de l'environnement [203]. Il existe aujourd'hui à définir la fonction de cette interaction. Les premiers résultats observés dans nos expériences sont en faveur d'une modulation de la réponse aux drogues. Ces résultats préliminaires sont à confirmer, notamment via des mutants de B7-H1 et B7.1 dépourvus de capacités d'interactions respectives.

Troisième partie :

Dosages de métabolites de la kynurénine dans les syndromes myélodysplasiques et corrélation clinico-biologiques : influence sur les cytopénies.

Metabolites of tryptophan catabolism are elevated in sera of patients with myelodysplastic syndromes and inhibit hematopoietic progenitors amplification.

Céline BERTHON ^{1, 2, 3}, Michaela FONTENAY ⁴, Selim CORM ¹, Alain DUHAMEL ^{2,5}, Julia SALLERON ^{2,5}, Julien ROSSIGNOL ³, Isabelle BRICHE ¹, Michel LHERMITTE ^{2, 6}, Bruno QUESNEL ^{1,2,3}.

Article en cours de soumission

Le tryptophane est métabolisé en kynurénine sous l'action de deux enzymes: indoleamine 2, 3-dioxygénase (IDO) et tryptophan 2,3-dioxygénase (TDO). Ces deux enzymes bloquent l'activation des cellules T et induisent une immunosuppression.

La kynurénine va être ensuite catabolisée en différents métabolites : acide kynurénique, l'acide 3 OH anthranilyque et l'acide anthranilyque. Ces métabolites ont aussi des effets négatifs sur les cellules T. Cependant, le rôle de ces métabolites n'a pas été évalué dans la physiopathologie des cancers.

Nous avons évalué le niveau d'expression du tryptophane et de ces métabolites dans le sérum d'une cohorte de 132 patients présentant un SMD.

Il existe une certaine corrélation entre les dosages des métabolites et les cytopénies. Les métabolites du tryptophane inhibent l'expansion des progéniteurs in vitro.

CHAPITRE 3

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Les blastes de LAM expriment à leur surface les molécules B7.1 et B7-2 qui vont se lier au récepteur CTLA-4 et donc inhiber les lymphocytes T [120]. Les autres molécules de la famille B7 n'ont fait l'objet que d'une étude partielle de leur expression sur les blastes de LAM.

L'équipe de Tamura a plus particulièrement étudié B7-H2, qui interagit avec ICOSL. Les auteurs ont montré que l'expression de cette molécule était corrélée avec une survie plus courte [155]. B7-H2 induit la prolifération de lymphocytes CD4⁺ et la sécrétion d'IL-4 et IL-10 in vitro. L'expression de cette molécule est augmentée après stimulation par le TNF- α et non par l'IFN- γ [155].

L'expression de B7-H3 à la surface des blastes fait l'objet de travaux publiés par l'équipe de Qiu. Cette expression est corrélée à l'expression de CD34, aux caryotypes défavorables, et à une survie sans rechute plus courte.

La molécule B7-H1 quant à elle est retrouvée sur de nombreuses cellules tumorales murines ou humaines [171, 188, 203]. En ce qui concerne son expression sur les blastes de LAM, les données sont plus contradictoires, avec une expression fréquente et importante pour certaines équipes, et beaucoup plus rare pour d'autres [84, 155]. Le rôle de cette molécule dans l'immunoévasion est aussi controversé [216-217]. Les expériences que nous avons menées permettent de montrer que la molécule B7-H1 n'est retrouvée que sur un petit nombre de patients au diagnostic (18%). Par contre, il semble que cette expression augmente chez les patients en rechute, même s'il nous faudrait plus d'échantillons au diagnostic et à la rechute pour confirmer ces données.

Le niveau d'expression de la molécule B7-H1 peut être modulé par l'IFN- γ , le TNF- α et le GM-CSF [61, 161, 179]. Dans ce travail, nous avons confirmé que l'IFN- γ augmentait l'expression de la molécule B7-H1 sur les blastes de LAM de patients, et sur des lignées cellulaires murines ou humaines [155, 216].

Une étude a été conduite préalablement dans notre laboratoire : il a été montré, dans un modèle de dormance tumorale, l'importance du niveau d'expression de B7-H1 sur l'inhibition de la lyse des cellules tumorales par les lymphocytes cytotoxiques [249]. Dans la présente étude, nous avons observé que certains blastes de patients exprimaient B7-H1. Les cellules T présentes dans l'environnement tumoral pourraient être à l'origine de la production de l'IFN- γ . Celui-ci induirait l'expression de B7-H1 sur les blastes, et donc inhiberait la lyse des cellules tumorales par l'inhibition des lymphocytes T cytotoxiques. L'expression de B7-H1 et des

autres molécules de costimulation est donc fortement régulée par le micro environnement tumoral.

Nous avons pu étudier quelques patients au diagnostic et à la rechute. Dans la majorité des cas, l'expression de B7-H1 est plus importante au moment de la rechute. On peut supposer que l'expression de B7-H1 a permis la persistance des cellules leucémiques pendant la phase de rémission complète, en leur permettant d'échapper à la lyse par les CTL. Il faudrait néanmoins plus de couples d'échantillons au diagnostic et à la rechute pour confirmer cette hypothèse.

Dans la deuxième partie de notre travail, nous avons pu mettre en évidence une augmentation de l'expression de B7-H1 sur les blastes après stimulation par les ligands des TLR 2, 4 et 9, et une diminution de la lyse tumorale par les CTL. Les blastes réfractaires à un ligand sont le plus souvent réfractaires aux autres ligands des TLR et à l'IFN- γ . L'induction de B7-H1 par du PGN (ligand de TLR2) est corrélée avec l'induction par le LPS (ligand TLR4) et l'IFN- γ .

Un précédent travail avait déjà montré l'implication des ligands des TLR2, 4 et 9 dans l'expression de B7-H1 sur les plasmocytes tumoraux de myélome multiple [188]. Récemment, l'équipe de Huang a confirmé l'implication des TLR4 dans l'induction de B7-H1 au niveau des cellules de Langherhans, afin d'induire une tolérance au niveau de la cavité buccale [189]. Il existe très peu de données sur TLR et LAM, les principales données hématologiques concernent l'étude de ces ligands dans les tumeurs lymphoïdes B.

Dans une large série de LAM à caryotype normal, l'équipe de Marcucci a montré qu'il existait une corrélation inverse entre l'expression des TLR2, 4 et 8 et l'expression de la famille des miRNA-181 ; et que cette corrélation est de mauvais pronostic [195]. Nous avons confirmé l'expression des TLR 2, 4 et 9 sur de nombreux blastes de patients. La stimulation des TLR 2 et 4 par leurs ligands respectifs induit l'expression de B7-H1 et augmente la résistance des blastes aux CTL. Cela confirme une probable implication du système immunitaire inné dans le développement des leucémies aiguës myéloïdes.

Il est encore bien difficile aujourd'hui de faire le lien entre immunité innée liée aux TLR et prolifération tumorale. Chez des souris âgées, on a observé une augmentation de la réponse au

stress et à l'inflammation avec une augmentation des TLR 4 [289]. Cette observation peut être le point de départ de la réflexion. En effet, l'incidence des LAM augmente avec l'âge. Il est possible d'émettre l'hypothèse que plus l'âge augmente, plus les cellules souches deviennent sensibles aux stimulations chroniques de l'inflammation via les TLR, ce qui induit donc une augmentation de la leucémogénèse. Par ailleurs, cela conforte l'hypothèse de l'implication des TLR dans la phase de rémission complète. La stimulation par les PAMPS va en effet entraîner l'expression de B7-H1 sur les cellules résiduelles, et donc un échappement de ces cellules au système immunitaire, avec secondairement une prolifération de celles-ci à l'origine des rechutes hématologiques (*Figure N°31*).

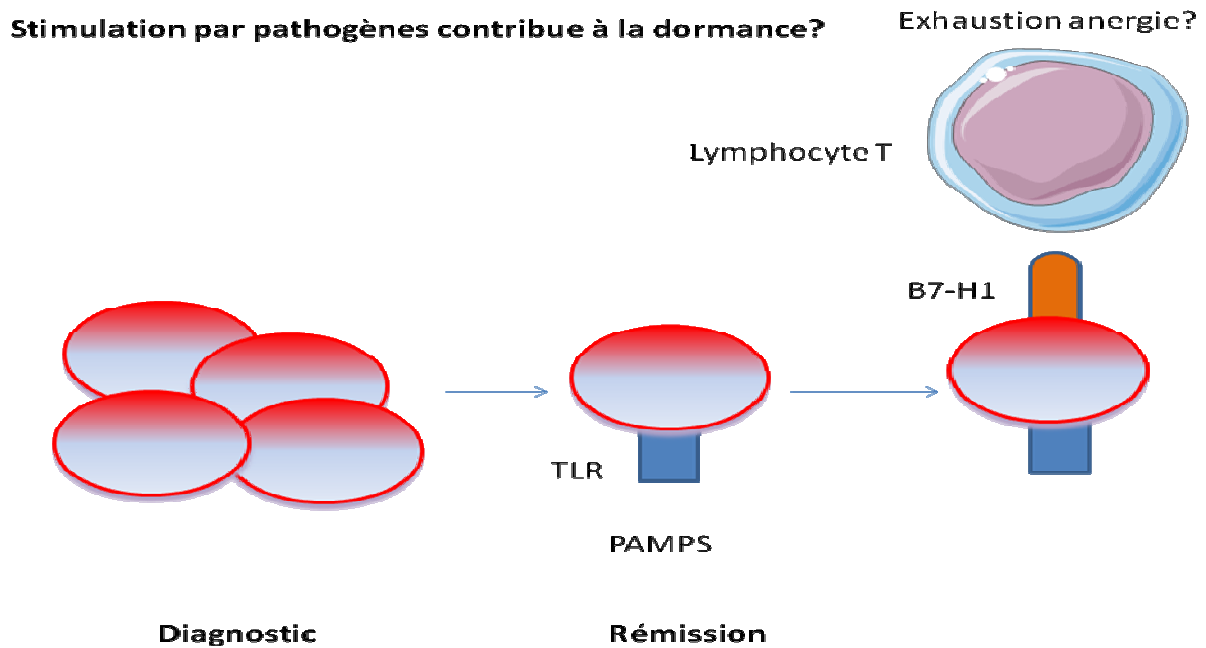


Figure N°31 : Hypothèse de l'implication des TLR dans l'immunoévasion.

Dans notre travail, nous avons mis en évidence l'implication de la voie MEK dans l'expression de B7-H1 sur les blastes de LAM, comme cela a déjà été montré pour le myélome multiple et les cancers de vessie [188, 317-318].

Nous avons testé différents inhibiteurs chimiques des différentes voies de signalisation. L'inhibition de PI3k et mTOR entraîne une discrète augmentation d'expression de B7-H1.

Les voies de régulation de B7-H1 sont différentes d'une cellule à l'autre, le ciblage d'une voie de signalisation aura donc un effet différent selon les tumeurs. L'inhibition de MEK diminue non seulement l'expression de B7-H1 sur les blastes, mais augmente aussi la sensibilité de ceux-ci aux CTL après stimulation par le LPS. Plusieurs petites molécules inhibitrices de MEK sont en cours de développement clinique chez les patients, notamment l'AZD6244 utilisé dans notre travail. Ces drogues sont actuellement utilisées afin de diminuer la prolifération tumorale ou augmenter la mort cellulaire en bloquant les signaux de croissance et de survie. Elles pourraient aussi tuer de manière indirecte les cellules tumorales en diminuant l'expression de B7-H1 sur celles-ci. Cela aurait pour effet de diminuer l'inhibition des CTL. Nous pouvons imaginer cibler l'expression de B7-H1 via l'utilisation d'inhibiteur de MEK après une allogreffe de moelle, afin d'augmenter l'effet GVL. La molécule B7-H1 pourrait ainsi devenir une cible thérapeutique d'immunothérapie via des petites molécules. Il ne faut néanmoins pas oublier que les voies de signalisation qui induisent l'expression de la molécule B7-H1 semblent différentes d'une pathologie à l'autre. Dans le myélome multiple, la voie prépondérante est aussi la voie MEK, par contre, dans les lymphomes non Hodgkinien la voie Jak Stat est impliquée. Il sera donc nécessaire de bien comprendre les voies de signalisation pour chaque pathologie afin d'optimiser une prise en charge thérapeutique ciblée.

Le développement des anticorps monoclonaux représente une avancée thérapeutique majeure dans la prise en charge des hémopathies. Pour le moment il existe peu de thérapies ciblées dans les LAM qui ont réellement montré leur efficacité. Seul l'anticorps monoclonal anti CD33 (Mylotarg) a montré un intérêt thérapeutique dans cette pathologie, mais sa place exacte dans la stratégie de traitement fait encore l'objet d'études.

Une meilleure compréhension de l'interaction des molécules B7 et de leur implication dans les mécanismes d'immunoévasion devrait permettre le développement de nouvelles drogues.

Différents essais cliniques ont été menés dans les tumeurs solides, pour évaluer l'efficacité des anticorps anti PD-1 ou anti-B7-H1. Le premier essai utilisait la molécule MDX-1106. Cette étude a été réalisée initialement sur 39 patients présentant des tumeurs solides avancées, puis sur une nouvelle série de 106 patients. Les premiers résultats ne retrouvent pas beaucoup de toxicité avec des signes d'efficacité [290-291]. Cet anticorps est en cours d'essai en association avec l'ipilimumab (anticorps anti CTLA-4).

D'autres anticorps anti PD-1 ont été évalués. L'équipe de Berger a utilisé un anticorps monoclonal anti PD-1 (CT-011), chez 17 patients présentant diverses hémopathies (LAM, lymphomes, myélome). Il s'agissait d'un essai de phase I, pour 33% des patients un bénéfice a été observé à titre de réponse tumorale avec une rémission complète sans toxicité importante [321]. Récemment à l'ASCO, des résultats intéressants ont été présentés avec un anticorps anti-PD-1 (BMS-936558) [290-291]. Cet essai a été réalisé chez des patients atteints de mélanomes avancés, de cancers pulmonaires non à petites cellules, de cancers de la prostate hormonaux résistants, de cancers du rein et de cancers colo rectaux. Les auteurs ont montré une réponse objective chez environ 25% des patients, avec une toxicité tolérable. La réponse est fonction du type de cancer avec une réponse plus importante dans les mélanomes et les cancers du rein. Elle semble durable chez des patients déjà lourdement traités au préalable. Il existe une corrélation entre l'expression de B7-H1 sur les cellules tumorales et l'importance de la réponse à l'anticorps monoclonal anti PD-1. Des essais sont aussi en cours avec des anticorps anti-B7-H1 (MDX-1105).

Il existe une réelle place thérapeutique pour ces innovations. L'anticorps PD-1 pourrait ainsi intervenir dans le traitement d'entretien des LAM. On pourrait l'envisager en entretien après avoir obtenu une rémission complète, c'est-à-dire au moment où la masse tumorale est la plus faible. Ils pourraient aussi servir après les allogreffes de cellules souches hématopoïétiques, afin de diminuer le nombre de rechutes.

Le développement de l'immunothérapie dans les LAM reste encore délicat de part l'implication de nombreux types cellulaires dans les phénomènes d'immunoévasion. Il existe une régulation faisant intervenir les cellules T, les T reg, les NK, les DC et les MSC. La complexité de ces intrications cellulaires rend la vaccination encore difficile. Il existe aussi des contraintes techniques quant à l'obtention de cellules DC vaccinales. Le choix de l'antigène optimal n'est également pas encore défini. Les LAM sont des pathologies

hétérogènes et les prochaines avancées d'immunothérapie devront prendre en compte ces éléments.

En plus de son rôle immunologique, l'implication non immunologique de B7-H1 dans la réponse aux chimiothérapies semble importante à confirmer. La suite du travail va consister en l'étude de clones inductibles obtenus par transfection stable des DA1-3b B7-H1 avec B7.1, afin de déterminer les éventuelles modulations de l'activité B7-H1 par cette dernière molécule. Des souris C3H vont recevoir les cellules DA1-3b B7-H1. Après 10 jours, la moitié des souris recevront de l'IPTG et ensuite seront plus ou moins traitées par de l'aracytine. Une autre étape importante sera l'injection de ces différents clones inductibles à des lignées de souris dépourvues de diverses cellules du système immunitaire, comme les souris nude, SCID, et NSG, puis par des déplétions spécifiques dans l'hôte immunocompétent. On peut toutefois aussi faire l'hypothèse d'un rôle non immunologique de B7-H1 sur la résistance aux drogues mais médié par des cellules du système immunitaire, par exemple la production de cytokines par les lymphocytes T stimulés par B7-H1 exprimé par les blastes, et venant induire une résistance à l'apoptose de ces mêmes blastes. Il est probable que les blastes de leucémies aiguës, probablement les cellules souches leucémiques, se localisent au sein de la niche hématopoïétique. Cette même niche est physiologiquement infiltrée par les lymphocytes T régulateurs, qui expriment PD-1 et donc sont susceptibles de répondre à l'expression de B7-H1. L'étude du rôle de B7-H1, d'expression spontanée ou induit, dans la constitution d'une maladie résiduelle des leucémies aiguës va donc nécessiter des expérimentations complexes tenant compte du microenvironnement.

Quelque soit le mécanisme impliqué, la confirmation de nos données *in vitro* *in vivo* sur une modulation de la chimiorésistance par B7-H1 permettrait d'envisager, chez les patients, l'utilisation de modulateurs d'expression de B7-H1 avec la chimiothérapie standard, afin d'augmenter les taux de rémission complète et surtout les qualités de réponse moléculaire, et ainsi diminuer les rechutes hématologiques. Récemment l'équipe de Qiu a présenté des résultats sur B7-H3 et LAM indiquant une expression de cette molécule dans une proportion notable de patients. Les premiers résultats sur une petite série de LAM au sein de notre équipe confirment ces données. A ce jour, le rôle de B7-H3 n'est pas identifié. La construction d'une lignée de DA1-3b B7-H3 est en cours afin d'étudier le rôle immunologique de cette molécule.

Les cibles possibles de thérapeutiques visant la famille B7 pourraient donc se révéler multiples.

Perspectives thérapeutiques

Comment ces concepts pourraient être utilisés en thérapeutique des LAM ? Il pourrait être envisagé, si l'hypothèse d'une modulation de la chimiosensibilité par B7-H1 s'avérait exact, l'administration d'anticorps anti B7-H1 ou anti PD-1 de manière concomitante aux polychimiothérapies conventionnelles d'induction et de consolidation des LAM. Ces mêmes anticorps pourraient être ensuite délivrés en entretien afin de restaurer une activité T efficace limitant les rechutes. Toutefois les stratégies anticorps ont quelques inconvénients. La pharmacocinétique n'est pas optimum. Par ailleurs, ceux-ci ne seront efficaces que si toutes les fonctions protectrices de B7-H1 nécessitent une interaction avec PD-1 et/ou B7.1, ce qui pour l'instant n'est pas formellement démontré. Une autre possibilité serait de cibler les voies de signalisation induisant l'expression de B7-H1. Nous avons déjà démontré que les inhibiteurs de MEK, par exemple l'AZD6244 de grade clinique, diminuait fortement l'expression de B7-H1. Les inhibiteurs de JAK sont probablement aussi de bon candidat, et peut être des stratégies combinées bloquant MEK et mTOR pourrait être envisagées. L'avantage de cette stratégie est que ces inhibiteurs ont une activité cytotoxique en eux même, il doit donc être possible à la fois d'inhiber des voies de survie dans les cellules leucémiques, et de les sensibiliser aux lymphocytes cytotoxiques. Ce type de stratégie ne serait toutefois probablement efficace que sur patients en rémission complète de très bonne qualité, où une faible population résiduelle reste à éliminer. Une dernière possibilité pourrait être le développement de petites molécules bloquant directement les interactions de B7-H1, en sachant toutefois que les interactions protéines/protéines sont réputées « undruggable » à quelques exceptions près, le défi est donc majeur. Ces stratégies thérapeutiques doivent impérativement être validées au préalable dans des modèles précliniques appropriés de maladie résiduelle.

Conclusion

Nous avons donc identifié un des mécanismes d'immunoévasion des blastes de leucémies aiguës myéloïdes, dont le mécanisme principal passe par l'expression de B7-H1 augmentée par des facteurs potentiels du microenvironnement, et à probablement de nombreux rôles dans la survie à long terme des cellules leucémiques résiduelles. L'expression de B7-H1 constitue un exemple de mécanisme majeur identifié à partir de modèle où l'on s'intéresse non pas aux effets immédiats sur une quelconque caractéristique tumorale, mais sur un rôle s'exerçant dans la durée. Compte tenu de l'évolution clinique des hémopathies malignes, et des cancers en général, marqués par de nombreuses récurrences de plus en plus souvent maîtrisables par de nouvelles thérapies, l'étude des mécanismes de survie des cellules tumorales à long terme est sûrement un objectif de recherche prioritaire.

CHAPITRE IV

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Burnett, A., M. Wetzler, and B. Lowenberg, *Therapeutic advances in acute myeloid leukemia*. J Clin Oncol, 2011. **29**(5): p. 487-94.
2. Ghebeh, H., et al., *Doxorubicin downregulates cell surface B7-H1 expression and upregulates its nuclear expression in breast cancer cells: role of B7-H1 as an anti-apoptotic molecule*. Breast Cancer Res, 2010. **12**(4): p. R48.
3. Burnet, M., *Cancer: a biological approach. III. Viruses associated with neoplastic conditions. IV. Practical applications*. Br Med J, 1957. **1**(5023): p. 841-7.
4. Silverstein, A., *History of Immunology*. Academic, San Diego CA, 1989.
5. Burnet, F.M., *The concept of immunological surveillance*. Prog Exp Tumor Res, 1970. **13**: p. 1-27.
6. Burnet, M., *Immunological Factors in the Process of Carcinogenesis*. Br Med Bull, 1964. **20**: p. 154-8.
7. Stutman, O., *Immunodepression and malignancy*. Adv Cancer Res, 1975. **22**: p. 261-422.
8. Klein, G., *Immunological surveillance against neoplasia*. Harvey Lect, 1973(69): p. 71-102.
9. Outzen, H.C., et al., *Spontaneous and induced tumor incidence in germfree "nude" mice*. J Reticuloendothel Soc, 1975. **17**(1): p. 1-9.
10. Herberman, R.B. and H.T. Holden, *Natural cell-mediated immunity*. Adv Cancer Res, 1978. **27**: p. 305-77.
11. Engel, A.M., et al., *MCA sarcomas induced in scid mice are more immunogenic than MCA sarcomas induced in congenic, immunocompetent mice*. Scand J Immunol, 1997. **45**(5): p. 463-70.
12. Dighe, A.S., et al., *Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors*. Immunity, 1994. **1**(6): p. 447-56.
13. Kaplan, D.H., et al., *Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(13): p. 7556-61.
14. Street, S.E., E. Cretney, and M.J. Smyth, *Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis*. Blood, 2001. **97**(1): p. 192-7.
15. van den Broek, M.E., et al., *Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice*. J Exp Med, 1996. **184**(5): p. 1781-90.
16. Smyth, M.J., et al., *Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells*. J Exp Med, 2000. **191**(4): p. 661-8.
17. Russell, J.H. and T.J. Ley, *Lymphocyte-mediated cytotoxicity*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 323-70.
18. Shankaran, V., et al., *IFN gamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity*. Nature, 2001. **410**(6832): p. 1107-11.
19. Penn, I., *Posttransplant malignancies*. Transplant Proc, 1999. **31**(1-2): p. 1260-2.
20. Birkeland, S.A., et al., *Cancer risk after renal transplantation in the Nordic countries, 1964-1986*. Int J Cancer, 1995. **60**(2): p. 183-9.
21. Boshoff, C. and R. Weiss, *AIDS-related malignancies*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(5): p. 373-82.
22. Penn, I., *Malignant melanoma in organ allograft recipients*. Transplantation, 1996. **61**(2): p. 274-8.
23. Pham, S.M., et al., *Solid tumors after heart transplantation: lethality of lung cancer*. Ann Thorac Surg, 1995. **60**(6): p. 1623-6.
24. Clark, W.H., Jr., et al., *Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression*. J Natl Cancer Inst, 1989. **81**(24): p. 1893-904.
25. Clemente, C.G., et al., *Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma*. Cancer, 1996. **77**(7): p. 1303-10.
26. Rilke, F., et al., *Prognostic significance of HER-2/neu expression in breast cancer and its relationship to other prognostic factors*. Int J Cancer, 1991. **49**(1): p. 44-9.
27. Nacopoulou, L., et al., *Prognostic significance of histologic host response in cancer of the large bowel*. Cancer, 1981. **47**(5): p. 930-6.

28. Smyth, M.J., N.Y. Crowe, and D.I. Godfrey, *NK cells and NKT cells collaborate in host protection from methylcholanthrene-induced fibrosarcoma*. *Int Immunol*, 2001. **13**(4): p. 459-63.
29. Cretney, E., et al., *Increased susceptibility to tumor initiation and metastasis in TNF-related apoptosis-inducing ligand-deficient mice*. *J Immunol*, 2002. **168**(3): p. 1356-61.
30. Swann, J.B., et al., *Demonstration of inflammation-induced cancer and cancer immunoediting during primary tumorigenesis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(2): p. 652-6.
31. Naugler, W.E., et al., *Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production*. *Science*, 2007. **317**(5834): p. 121-4.
32. Engel, A.M., et al., *Methylcholanthrene-induced sarcomas in nude mice have short induction times and relatively low levels of surface MHC class I expression*. *APMIS*, 1996. **104**(9): p. 629-39.
33. Girardi, M., et al., *Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells*. *Science*, 2001. **294**(5542): p. 605-9.
34. Girardi, M., et al., *The distinct contributions of murine T cell receptor (TCR)gammadelta+ and TCRalpha+ T cells to different stages of chemically induced skin cancer*. *J Exp Med*, 2003. **198**(5): p. 747-55.
35. Simson, L., et al., *Regulation of carcinogenesis by IL-5 and CCL11: a potential role for eosinophils in tumor immune surveillance*. *J Immunol*, 2007. **178**(7): p. 4222-9.
36. Dunn, G.P., et al., *A critical function for type I interferons in cancer immunoediting*. *Nat Immunol*, 2005. **6**(7): p. 722-9.
37. Smyth, M.J., M. Taniguchi, and S.E. Street, *The anti-tumor activity of IL-12: mechanisms of innate immunity that are model and dose dependent*. *J Immunol*, 2000. **165**(5): p. 2665-70.
38. Johansen, C., et al., *MK2 regulates the early stages of skin tumor promotion*. *Carcinogenesis*, 2009. **30**(12): p. 2100-8.
39. Moore, R.J., et al., *Mice deficient in tumor necrosis factor-alpha are resistant to skin carcinogenesis*. *Nat Med*, 1999. **5**(7): p. 828-31.
40. Gebhardt, C., et al., *RAGE signaling sustains inflammation and promotes tumor development*. *J Exp Med*, 2008. **205**(2): p. 275-85.
41. Muller, A.J., et al., *Chronic inflammation that facilitates tumor progression creates local immune suppression by inducing indoleamine 2,3 dioxygenase*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(44): p. 17073-8.
42. Yusuf, N., et al., *Antagonistic roles of CD4+ and CD8+ T-cells in 7,12-dimethylbenz(a)anthracene cutaneous carcinogenesis*. *Cancer Res*, 2008. **68**(10): p. 3924-30.
43. Langowski, J.L., et al., *IL-23 promotes tumour incidence and growth*. *Nature*, 2006. **442**(7101): p. 461-5.
44. Teng, M.W., et al., *IL-23 suppresses innate immune response independently of IL-17A during carcinogenesis and metastasis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(18): p. 8328-33.
45. Aguirre-Ghiso, J.A., *Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy*. *Nat Rev Cancer*, 2007. **7**(11): p. 834-46.
46. Koebel, C.M., et al., *Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state*. *Nature*, 2007. **450**(7171): p. 903-7.
47. Farrar, J.D., et al., *Cancer dormancy. VII. A regulatory role for CD8+ T cells and IFN-gamma in establishing and maintaining the tumor-dormant state*. *J Immunol*, 1999. **162**(5): p. 2842-9.
48. Loeser, S., et al., *Spontaneous tumor rejection by cbl-b-deficient CD8+ T cells*. *J Exp Med*, 2007. **204**(4): p. 879-91.
49. Saudemont, A. and B. Quesnel, *In a model of tumor dormancy, long-term persistent leukemic cells have increased B7-H1 and B7.1 expression and resist CTL-mediated lysis*. *Blood*, 2004. **104**(7): p. 2124-33.
50. Dunn, G.P., et al., *Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape*. *Nat Immunol*, 2002. **3**(11): p. 991-8.

51. Zitvogel, L., A. Tesniere, and G. Kroemer, *Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(10): p. 715-27.
52. Dunn, G.P., L.J. Old, and R.D. Schreiber, *The three Es of cancer immunoediting*. Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 329-60.
53. Kyewski, B. and L. Klein, *A central role for central tolerance*. Annu Rev Immunol, 2006. **24**: p. 571-606.
54. Restifo, N.P., et al., *Loss of functional beta 2-microglobulin in metastatic melanomas from five patients receiving immunotherapy*. J Natl Cancer Inst, 1996. **88**(2): p. 100-8.
55. Jager, E., et al., *Inverse relationship of melanocyte differentiation antigen expression in melanoma tissues and CD8+ cytotoxic-T-cell responses: evidence for immunoselection of antigen-loss variants in vivo*. Int J Cancer, 1996. **66**(4): p. 470-6.
56. Dunn, G.P., et al., *IFN unresponsiveness in LNCaP cells due to the lack of JAK1 gene expression*. Cancer Res, 2005. **65**(8): p. 3447-53.
57. Stern-Ginossar, N., et al., *Human microRNAs regulate stress-induced immune responses mediated by the receptor NKG2D*. Nat Immunol, 2008. **9**(9): p. 1065-73.
58. Wang, T., et al., *Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells*. Nat Med, 2004. **10**(1): p. 48-54.
59. Kataoka, T., et al., *FLIP prevents apoptosis induced by death receptors but not by perforin/granzyme B, chemotherapeutic drugs, and gamma irradiation*. J Immunol, 1998. **161**(8): p. 3936-42.
60. Shin, M.S., et al., *Mutations of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 1 (TRAIL-R1) and receptor 2 (TRAIL-R2) genes in metastatic breast cancers*. Cancer Res, 2001. **61**(13): p. 4942-6.
61. Dong, H., et al., *Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion*. Nat Med, 2002. **8**(8): p. 793-800.
62. Tripathi, P. and S. Agrawal, *Non-classical HLA-G antigen and its role in the cancer progression*. Cancer Invest, 2006. **24**(2): p. 178-86.
63. Derre, L., et al., *Expression and release of HLA-E by melanoma cells and melanocytes: potential impact on the response of cytotoxic effector cells*. J Immunol, 2006. **177**(5): p. 3100-7.
64. Gabilovich, D.I., et al., *Antibodies to vascular endothelial growth factor enhance the efficacy of cancer immunotherapy by improving endogenous dendritic cell function*. Clin Cancer Res, 1999. **5**(10): p. 2963-70.
65. Wrzesinski, S.H., Y.Y. Wan, and R.A. Flavell, *Transforming growth factor-beta and the immune response: implications for anticancer therapy*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(18 Pt 1): p. 5262-70.
66. Aruga, A., et al., *Type 1 versus type 2 cytokine release by Vbeta T cell subpopulations determines in vivo antitumor reactivity: IL-10 mediates a suppressive role*. J Immunol, 1997. **159**(2): p. 664-73.
67. Uyttenhove, C., et al., *Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase*. Nat Med, 2003. **9**(10): p. 1269-74.
68. Gabilovich, D.I. and S. Nagaraj, *Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(3): p. 162-74.
69. Sica, A., et al., *Macrophage polarization in tumour progression*. Semin Cancer Biol, 2008. **18**(5): p. 349-55.
70. Dunn, G.P., L.J. Old, and R.D. Schreiber, *The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting*. Immunity, 2004. **21**(2): p. 137-48.
71. Mollrem, J.J., et al., *Evidence that specific T lymphocytes may participate in the elimination of chronic myelogenous leukemia*. Nat Med, 2000. **6**(9): p. 1018-23.
72. Savoia, P., et al., *Loss of surface HLA class I molecules in leukemic myeloblasts is correlated with an increased leukocyte concentration at onset*. Haematologica, 1992. **77**(2): p. 127-9.

73. Demanet, C., et al., *Down-regulation of HLA-A and HLA-Bw6, but not HLA-Bw4, allospecificities in leukemic cells: an escape mechanism from CTL and NK attack?* Blood, 2004. **103**(8): p. 3122-30.
74. Brouwer, R.E., et al., *Loss or downregulation of HLA class I expression at the allelic level in acute leukemia is infrequent but functionally relevant, and can be restored by interferon.* Hum Immunol, 2002. **63**(3): p. 200-10.
75. Wetzler, M., et al., *HLA-DR antigen-negative acute myeloid leukemia.* Leukemia, 2003. **17**(4): p. 707-15.
76. Chamuleau, M.E., et al., *Class II-associated invariant chain peptide expression on myeloid leukemic blasts predicts poor clinical outcome.* Cancer Res, 2004. **64**(16): p. 5546-50.
77. van Luijn, M.M., et al., *Class II-associated invariant chain peptide down-modulation enhances the immunogenicity of myeloid leukemic blasts resulting in increased CD4+ T-cell responses.* Haematologica, 2010. **95**(3): p. 485-93.
78. Panoskaltsis, N., C.D. Reid, and S.C. Knight, *Quantification and cytokine production of circulating lymphoid and myeloid cells in acute myelogenous leukaemia.* Leukemia, 2003. **17**(4): p. 716-30.
79. de Bont, E.S., et al., *Vascular endothelial growth factor secretion is an independent prognostic factor for relapse-free survival in pediatric acute myeloid leukemia patients.* Clin Cancer Res, 2002. **8**(9): p. 2856-61.
80. Menetrier-Caux, C., et al., *Inhibition of the differentiation of dendritic cells from CD34(+) progenitors by tumor cells: role of interleukin-6 and macrophage colony-stimulating factor.* Blood, 1998. **92**(12): p. 4778-91.
81. Pizzolo, G., et al., *Natural killer cell function and lymphoid subpopulations in acute non-lymphoblastic leukaemia in complete remission.* Br J Cancer, 1988. **58**(3): p. 368-72.
82. Costello, R.T., et al., *Defective expression and function of natural killer cell-triggering receptors in patients with acute myeloid leukemia.* Blood, 2002. **99**(10): p. 3661-7.
83. Tourneur, L., et al., *Absence or low expression of fas-associated protein with death domain in acute myeloid leukemia cells predicts resistance to chemotherapy and poor outcome.* Cancer Res, 2004. **64**(21): p. 8101-8.
84. Salih, H.R., et al., *Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia.* Blood, 2003. **102**(4): p. 1389-96.
85. Nguyen, S., 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**(10): p. 4135-42.
86. Cimino, G., et al., *Serum interleukin-2 (IL-2), soluble IL-2 receptors and tumor necrosis factor-alfa levels are significantly increased in acute myeloid leukemia patients.* Leukemia, 1991. **5**(1): p. 32-5.
87. Schimmer, A.D., et al., *Functional blocks in caspase activation pathways are common in leukemia and predict patient response to induction chemotherapy.* Cancer Res, 2003. **63**(6): p. 1242-8.
88. Lion, E., et al., *Natural killer cell immune escape in acute myeloid leukemia.* Leukemia, 2012.
89. Fauriat, C., et al., *Defective killing of dendritic cells by autologous natural killer cells from acute myeloid leukemia patients.* Blood, 2005. **106**(6): p. 2186-8.
90. Grouard, G., et al., *The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand.* J Exp Med, 1997. **185**(6): p. 1101-11.
91. Mohty, M., et al., *Circulating blood dendritic cells from myeloid leukemia patients display quantitative and cytogenetic abnormalities as well as functional impairment.* Blood, 2001. **98**(13): p. 3750-6.
92. Jonuleit, H., et al., *Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells.* J Exp Med, 2000. **192**(9): p. 1213-22.

93. Dhodapkar, M.V., et al., *Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells*. J Exp Med, 2001. **193**(2): p. 233-8.
94. Wang, X., et al., *Increased population of CD4(+)CD25(high), regulatory T cells with their higher apoptotic and proliferating status in peripheral blood of acute myeloid leukemia patients*. Eur J Haematol, 2005. **75**(6): p. 468-76.
95. Shenghui, Z., et al., *Elevated frequencies of CD4(+) CD25(+) CD127lo regulatory T cells is associated to poor prognosis in patients with acute myeloid leukemia*. Int J Cancer, 2011. **129**(6): p. 1373-81.
96. Weiden, P.L., et al., *Antileukemic effect of graft-versus-host disease contributes to improved survival after allogeneic marrow transplantation*. Transplant Proc, 1981. **13**(1 Pt 1): p. 248-51.
97. Bicigalupo, A., et al., *Increased risk of leukemia relapse with high dose cyclosporine after allogeneic marrow transplantation for acute leukemia: 10 year follow-up of a randomized study*. Blood, 2001. **98**(10): p. 3174-5.
98. Marmont, A.M., et al., *T-cell depletion of HLA-identical transplants in leukemia*. Blood, 1991. **78**(8): p. 2120-30.
99. Collins, R.H., Jr., et al., *Donor leukocyte infusions in 140 patients with relapsed malignancy after allogeneic bone marrow transplantation*. J Clin Oncol, 1997. **15**(2): p. 433-44.
100. Kolb, H.J., *Donor leukocyte transfusions for treatment of leukemic relapse after bone marrow transplantation*. EBMT Immunology and Chronic Leukemia Working Parties. Vox Sang, 1998. **74 Suppl 2**: p. 321-9.
101. Nadal, E., et al., *Adjuvant interleukin-2 therapy for patients refractory to donor lymphocyte infusions*. Exp Hematol, 2004. **32**(2): p. 218-23.
102. Slavin, S., et al., *Allogeneic cell therapy with donor peripheral blood cells and recombinant human interleukin-2 to treat leukemia relapse after allogeneic bone marrow transplantation*. Blood, 1996. **87**(6): p. 2195-204.
103. Caux, C., et al., *CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha*. Adv Exp Med Biol, 1997. **417**: p. 21-5.
104. Romani, N., et al., *Proliferating dendritic cell progenitors in human blood*. J Exp Med, 1994. **180**(1): p. 83-93.
105. Charbonnier, A., et al., *Human acute myeloblastic leukemia cells differentiate in vitro into mature dendritic cells and induce the differentiation of cytotoxic T cells against autologous leukemias*. Eur J Immunol, 1999. **29**(8): p. 2567-78.
106. Panoskaltsis, N., et al., *Optimal cytokine stimulation for the enhanced generation of leukemic dendritic cells in short-term culture*. Leuk Res, 2002. **26**(2): p. 191-201.
107. Westers, T.M., et al., *Rapid generation of antigen-presenting cells from leukaemic blasts in acute myeloid leukaemia*. Cancer Immunol Immunother, 2003. **52**(1): p. 17-27.
108. Cignetti, A., et al., *Leukemia-derived immature dendritic cells differentiate into functionally competent mature dendritic cells that efficiently stimulate T cell responses*. J Immunol, 2004. **173**(4): p. 2855-65.
109. Westers, T.M., et al., *Quantification of T-cell-mediated apoptosis in heterogeneous leukemia populations using four-color multiparameter flow cytometry*. Cytometry A, 2005. **66**(1): p. 71-7.
110. Choudhury, B.A., et al., *Dendritic cells derived in vitro from acute myelogenous leukemia cells stimulate autologous, antileukemic T-cell responses*. Blood, 1999. **93**(3): p. 780-6.
111. Westers, T.M., et al., *Leukemia-derived dendritic cells in acute myeloid leukemia exhibit potent migratory capacity*. Leukemia, 2005. **19**(7): p. 1270-2.
112. Houtenbos, I., et al., *TNF-alpha receptor 1 expression on acute myeloid leukemic blasts predicts differentiation into leukemic dendritic cells*. Leukemia, 2004. **18**(6): p. 1149-53.
113. Mohty, M., et al., *Identification of precursors of leukemic dendritic cells differentiated from patients with acute myeloid leukemia*. Leukemia, 2002. **16**(11): p. 2267-74.

114. Re, F., et al., *Expression of CD86 in acute myelogenous leukemia is a marker of dendritic/monocytic lineage*. *Exp Hematol*, 2002. **30**(2): p. 126-34.
115. Zheng, R., A.D. Friedman, and D. Small, *Targeted inhibition of FLT3 overcomes the block to myeloid differentiation in 32Dcl3 cells caused by expression of FLT3/ITD mutations*. *Blood*, 2002. **100**(12): p. 4154-61.
116. Zeis, M., et al., *Generation of cytotoxic responses in mice and human individuals against hematological malignancies using survivin-RNA-transfected dendritic cells*. *J Immunol*, 2003. **170**(11): p. 5391-7.
117. Schui, D.K., et al., *Inhibiting effects on the induction of cytotoxic T lymphocytes by dendritic cells pulsed with lysates from acute myeloid leukemia blasts*. *Leuk Res*, 2002. **26**(4): p. 383-9.
118. Fujii, S., et al., *Analysis of a chronic myelogenous leukemia patient vaccinated with leukemic dendritic cells following autologous peripheral blood stem cell transplantation*. *Jpn J Cancer Res*, 1999. **90**(10): p. 1117-29.
119. Brossart, P., et al., *The epithelial tumor antigen MUC1 is expressed in hematological malignancies and is recognized by MUC1-specific cytotoxic T-lymphocytes*. *Cancer Res*, 2001. **61**(18): p. 6846-50.
120. Vereecque, R., A. Saudemont, and B. Quesnel, *Cytosine arabinoside induces costimulatory molecule expression in acute myeloid leukemia cells*. *Leukemia*, 2004. **18**(7): p. 1223-30.
121. Stumbles, P.A., et al., *Cutting edge: tumor-specific CTL are constitutively cross-armed in draining lymph nodes and transiently disseminate to mediate tumor regression following systemic CD40 activation*. *J Immunol*, 2004. **173**(10): p. 5923-8.
122. Langenkamp, A., et al., *Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells*. *Nat Immunol*, 2000. **1**(4): p. 311-6.
123. Hirst, W.J., et al., *Enhanced immune costimulatory activity of primary acute myeloid leukaemia blasts after retrovirus-mediated gene transfer of B7.1*. *Gene Ther*, 1997. **4**(7): p. 691-9.
124. Dunussi-Joannopoulos, K., et al., *Gene immunotherapy in murine acute myeloid leukemia: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor tumor cell vaccines elicit more potent antitumor immunity compared with B7 family and other cytokine vaccines*. *Blood*, 1998. **91**(1): p. 222-30.
125. Dunussi-Joannopoulos, K., et al., *Vaccines with interleukin-12-transduced acute myeloid leukemia cells elicit very potent therapeutic and long-lasting protective immunity*. *Blood*, 1999. **94**(12): p. 4263-73.
126. Ossenkoppele, G.J., et al., *Vaccination of chronic myeloid leukemia patients with autologous in vitro cultured leukemic dendritic cells*. *Leukemia*, 2003. **17**(7): p. 1424-6.
127. Houtenbos, I., et al., *Feasibility of clinical dendritic cell vaccination in acute myeloid leukemia*. *Immunobiology*, 2006. **211**(6-8): p. 677-85.
128. Li, L., et al., *Immunotherapy for patients with acute myeloid leukemia using autologous dendritic cells generated from leukemic blasts*. *Int J Oncol*, 2006. **28**(4): p. 855-61.
129. Spisek, R., et al., *Induction of leukemia-specific cytotoxic response by cross-presentation of late-apoptotic leukemic blasts by autologous dendritic cells of nonleukemic origin*. *Cancer Res*, 2002. **62**(10): p. 2861-8.
130. Heslop, H.E., F.K. Stevenson, and J.J. Mouldrem, *Immunotherapy of hematologic malignancy*. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2003: p. 331-49.
131. Csako, G., et al., *Cloning of human lymphocytes reactive with autologous leukemia cells*. *Cancer Res*, 1980. **40**(9): p. 3218-21.
132. Boyer, M.W., et al., *The role of B7 costimulation by murine acute myeloid leukemia in the generation and function of a CD8+ T-cell line with potent in vivo graft-versus-leukemia properties*. *Blood*, 1997. **89**(9): p. 3477-85.
133. Sauer, M.G., et al., *A novel system for simultaneous in vivo tracking and biological assessment of leukemia cells and ex vivo generated leukemia-reactive cytotoxic T cells*. *Cancer Res*, 2004. **64**(11): p. 3914-21.

134. Furugaki, K., et al., *DNA vaccination with all-trans retinoic acid treatment induces long-term survival and elicits specific immune responses requiring CD4+ and CD8+ T-cell activation in an acute promyelocytic leukemia mouse model*. *Blood*, 2010. **115**(3): p. 653-6.
135. Sharpe, A.H. and G.J. Freeman, *The B7-CD28 superfamily*. *Nat Rev Immunol*, 2002. **2**(2): p. 116-26.
136. Schwartz, J.C., et al., *Structural mechanisms of costimulation*. *Nat Immunol*, 2002. **3**(5): p. 427-34.
137. Carreno, B.M. and M. Collins, *The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses*. *Annu Rev Immunol*, 2002. **20**: p. 29-53.
138. Greenwald, R.J., G.J. Freeman, and A.H. Sharpe, *The B7 family revisited*. *Annu Rev Immunol*, 2005. **23**: p. 515-48.
139. Shin, T., et al., *In vivo costimulatory role of B7-DC in tuning T helper cell 1 and cytotoxic T lymphocyte responses*. *J Exp Med*, 2005. **201**(10): p. 1531-41.
140. Collins, M., V. Ling, and B.M. Carreno, *The B7 family of immune-regulatory ligands*. *Genome Biol*, 2005. **6**(6): p. 223.
141. Zhang, X., et al., *Crystal structure of the receptor-binding domain of human B7-2: insights into organization and signaling*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(5): p. 2586-91.
142. Collins, A.V., et al., *The interaction properties of costimulatory molecules revisited*. *Immunity*, 2002. **17**(2): p. 201-10.
143. Zhang, X., et al., *Structural and functional analysis of the costimulatory receptor programmed death-1*. *Immunity*, 2004. **20**(3): p. 337-47.
144. Borriello, F., et al., *B7-1 and B7-2 have overlapping, critical roles in immunoglobulin class switching and germinal center formation*. *Immunity*, 1997. **6**(3): p. 303-13.
145. Schweitzer, A.N. and A.H. Sharpe, *Studies using antigen-presenting cells lacking expression of both B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) show distinct requirements for B7 molecules during priming versus restimulation of Th2 but not Th1 cytokine production*. *J Immunol*, 1998. **161**(6): p. 2762-71.
146. Waterhouse, P., et al., *Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctla-4*. *Science*, 1995. **270**(5238): p. 985-8.
147. Hutloff, A., et al., *ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28*. *Nature*, 1999. **397**(6716): p. 263-6.
148. Dong, C., et al., *ICOS co-stimulatory receptor is essential for T-cell activation and function*. *Nature*, 2001. **409**(6816): p. 97-101.
149. Dong, H., et al., *B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion*. *Nat Med*, 1999. **5**(12): p. 1365-9.
150. Butte, M.J., et al., *Interaction of human PD-L1 and B7-1*. *Mol Immunol*, 2008. **45**(13): p. 3567-72.
151. Agata, Y., et al., *Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes*. *Int Immunol*, 1996. **8**(5): p. 765-72.
152. Keir, M.E., et al., *Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance*. *J Exp Med*, 2006. **203**(4): p. 883-95.
153. Sun, M., et al., *Characterization of mouse and human B7-H3 genes*. *J Immunol*, 2002. **168**(12): p. 6294-7.
154. Zou, W. and L. Chen, *Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment*. *Nat Rev Immunol*, 2008. **8**(6): p. 467-77.
155. Kondo, A., et al., *Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha induce an immunoinhibitory molecule, B7-H1, via nuclear factor-kappaB activation in blasts in myelodysplastic syndromes*. *Blood*, 2010. **116**(7): p. 1124-31.
156. Tamura, H., et al., *Expression of functional B7-H2 and B7.2 costimulatory molecules and their prognostic implications in de novo acute myeloid leukemia*. *Clin Cancer Res*, 2005. **11**(16): p. 5708-17.

157. Ghebeh, H., et al., *Expression of B7-H1 in breast cancer patients is strongly associated with high proliferative Ki-67-expressing tumor cells*. *Int J Cancer*, 2007. **121**(4): p. 751-8.
158. Geng, L., et al., *B7-H1 up-regulated expression in human pancreatic carcinoma tissue associates with tumor progression*. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2008. **134**(9): p. 1021-7.
159. Konishi, J., et al., *B7-H1 expression on non-small cell lung cancer cells and its relationship with tumor-infiltrating lymphocytes and their PD-1 expression*. *Clin Cancer Res*, 2004. **10**(15): p. 5094-100.
160. Rosenwald, A., et al., *Molecular diagnosis of primary mediastinal B cell lymphoma identifies a clinically favorable subgroup of diffuse large B cell lymphoma related to Hodgkin lymphoma*. *J Exp Med*, 2003. **198**(6): p. 851-62.
161. Yao, Y., et al., *B7-H4 is preferentially expressed in non-dividing brain tumor cells and in a subset of brain tumor stem-like cells*. *J Neurooncol*, 2008. **89**(2): p. 121-9.
162. H, Q., *COSTIMULATORY MOLECULE B7-H3 IN ACUTE LEUKEMIA: EXPRESSION CHARACTERISTICS AND PROGNOSTIC SIGNIFICANCE*. EHA 2012.
163. Curiel, T.J., et al., *Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity*. *Nat Med*, 2003. **9**(5): p. 562-7.
164. Blank, C., et al., *Blockade of PD-L1 (B7-H1) augments human tumor-specific T cell responses in vitro*. *Int J Cancer*, 2006. **119**(2): p. 317-27.
165. Salceda, S., et al., *The immunomodulatory protein B7-H4 is overexpressed in breast and ovarian cancers and promotes epithelial cell transformation*. *Exp Cell Res*, 2005. **306**(1): p. 128-41.
166. Simon, I., et al., *B7-H4 is over-expressed in early-stage ovarian cancer and is independent of CA125 expression*. *Gynecol Oncol*, 2007. **106**(2): p. 334-41.
167. Flies, D.B. and L. Chen, *The new B7s: playing a pivotal role in tumor immunity*. *J Immunother*, 2007. **30**(3): p. 251-60.
168. Yamazaki, T., et al., *Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC*. *J Immunol*, 2002. **169**(10): p. 5538-45.
169. Kryczek, I., et al., *Relationship between B7-H4, regulatory T cells, and patient outcome in human ovarian carcinoma*. *Cancer Res*, 2007. **67**(18): p. 8900-5.
170. Loos, M., et al., *Clinical significance and regulation of the costimulatory molecule B7-H1 in pancreatic cancer*. *Cancer Lett*, 2008. **268**(1): p. 98-109.
171. Wu, C., et al., *Immunohistochemical localization of programmed death-1 ligand-1 (PD-L1) in gastric carcinoma and its clinical significance*. *Acta Histochem*, 2006. **108**(1): p. 19-24.
172. Boorjian, S.A., et al., *T-cell coregulatory molecule expression in urothelial cell carcinoma: clinicopathologic correlations and association with survival*. *Clin Cancer Res*, 2008. **14**(15): p. 4800-8.
173. Nakanishi, J., et al., *Overexpression of B7-H1 (PD-L1) significantly associates with tumor grade and postoperative prognosis in human urothelial cancers*. *Cancer Immunol Immunother*, 2007. **56**(8): p. 1173-82.
174. Hamanishi, J., et al., *Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(9): p. 3360-5.
175. Nomi, T., et al., *Clinical significance and therapeutic potential of the programmed death-1 ligand/programmed death-1 pathway in human pancreatic cancer*. *Clin Cancer Res*, 2007. **13**(7): p. 2151-7.
176. Sun, Y., et al., *B7-H3 and B7-H4 expression in non-small-cell lung cancer*. *Lung Cancer*, 2006. **53**(2): p. 143-51.
177. Zang, X., et al., *B7-H3 and B7x are highly expressed in human prostate cancer and associated with disease spread and poor outcome*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(49): p. 19458-63.
178. Tringler, B., et al., *B7-h4 is highly expressed in ductal and lobular breast cancer*. *Clin Cancer Res*, 2005. **11**(5): p. 1842-8.

179. Awadallah, N.S., et al., *Detection of B7-H4 and p53 in pancreatic cancer: potential role as a cytological diagnostic adjunct*. *Pancreas*, 2008. **36**(2): p. 200-6.
180. He, X.H., L.H. Xu, and Y. Liu, *Identification of a novel splice variant of human PD-L1 mRNA encoding an isoform-lacking Igv-like domain*. *Acta Pharmacol Sin*, 2005. **26**(4): p. 462-8.
181. Brown, J.A., et al., *Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production*. *J Immunol*, 2003. **170**(3): p. 1257-66.
182. Eppihimer, M.J., et al., *Expression and regulation of the PD-L1 immunoinhibitory molecule on microvascular endothelial cells*. *Microcirculation*, 2002. **9**(2): p. 133-45.
183. Schreiner, B., et al., *Interferon-beta enhances monocyte and dendritic cell expression of B7-H1 (PD-L1), a strong inhibitor of autologous T-cell activation: relevance for the immune modulatory effect in multiple sclerosis*. *J Neuroimmunol*, 2004. **155**(1-2): p. 172-82.
184. Corthals, S.L., et al., *Differential immune effects mediated by Toll-like receptors stimulation in precursor B-cell acute lymphoblastic leukaemia*. *Br J Haematol*, 2006. **132**(4): p. 452-8.
185. Chiron, D., et al., *Toll-like receptors: lessons to learn from normal and malignant human B cells*. *Blood*, 2008. **112**(6): p. 2205-13.
186. Webb, R.N., J.M. Cruse, and R.E. Lewis, *Differential cytokine and Toll-like receptor expression in leukemia*. *Exp Mol Pathol*, 2007. **83**(3): p. 464-70.
187. Spaner, D.E., et al., *Obstacles to effective Toll-like receptor agonist therapy for hematologic malignancies*. *Oncogene*, 2008. **27**(2): p. 208-17.
188. Spaner, D.E. and A. Masellis, *Toll-like receptor agonists in the treatment of chronic lymphocytic leukemia*. *Leukemia*, 2007. **21**(1): p. 53-60.
189. Spaner, D.E., et al., *Immunomodulatory effects of Toll-like receptor-7 activation on chronic lymphocytic leukemia cells*. *Leukemia*, 2006. **20**(2): p. 286-95.
190. Liu, J., et al., *Plasma cells from multiple myeloma patients express B7-H1 (PD-L1) and increase expression after stimulation with IFN- γ and TLR ligands via a MyD88-, TRAF6-, and MEK-dependent pathway*. *Blood*, 2007. **110**(1): p. 296-304.
191. Huang, B., et al., *Toll-like receptors on tumor cells facilitate evasion of immune surveillance*. *Cancer Res*, 2005. **65**(12): p. 5009-14.
192. Allam, J.P., et al., *Toll-like receptor 4 ligation enforces tolerogenic properties of oral mucosal Langerhans cells*. *J Allergy Clin Immunol*, 2008. **121**(2): p. 368-374 e1.
193. el-Shami, K. and B.D. Smith, *Immunotherapy for myeloid leukemias: current status and future directions*. *Leukemia*, 2008. **22**(9): p. 1658-64.
194. Saudemont, A., et al., *Induction of leukemia-specific CD8+ cytotoxic T cells with autologous myeloid leukemic cells matured with a fiber-modified adenovirus encoding TNF-alpha*. *Mol Ther*, 2005. **11**(6): p. 950-9.
195. Marcucci, G., et al., *MicroRNA expression in cytogenetically normal acute myeloid leukemia*. *N Engl J Med*, 2008. **358**(18): p. 1919-28.
196. Lee, S.J., et al., *Interferon regulatory factor-1 is prerequisite to the constitutive expression and IFN-gamma-induced upregulation of B7-H1 (CD274)*. *FEBS Lett*, 2006. **580**(3): p. 755-62.
197. Parsa, A.T., et al., *Loss of tumor suppressor PTEN function increases B7-H1 expression and immunoresistance in glioma*. *Nat Med*, 2007. **13**(1): p. 84-8.
198. Dong, H. and X. Chen, *Immunoregulatory role of B7-H1 in chronicity of inflammatory responses*. *Cell Mol Immunol*, 2006. **3**(3): p. 179-87.
199. Nishimura, H., et al., *Developmentally regulated expression of the PD-1 protein on the surface of double-negative (CD4-CD8-) thymocytes*. *Int Immunol*, 1996. **8**(5): p. 773-80.
200. Ueda, H., et al., *Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease*. *Nature*, 2003. **423**(6939): p. 506-11.
201. Wan, B., et al., *Aberrant regulation of synovial T cell activation by soluble costimulatory molecules in rheumatoid arthritis*. *J Immunol*, 2006. **177**(12): p. 8844-50.
202. Lin, D.Y., et al., *The PD-1/PD-L1 complex resembles the antigen-binding Fv domains of antibodies and T cell receptors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(8): p. 3011-6.

203. Butte, M.J., et al., *Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses*. *Immunity*, 2007. **27**(1): p. 111-22.
204. Andorsky, D.J., et al., *Programmed death ligand 1 is expressed by non-hodgkin lymphomas and inhibits the activity of tumor-associated T cells*. *Clin Cancer Res*, 2011. **17**(13): p. 4232-44.
205. Xerri, L., et al., *Programmed death 1 is a marker of angioimmunoblastic T-cell lymphoma and B-cell small lymphocytic lymphoma/chronic lymphocytic leukemia*. *Hum Pathol*, 2008. **39**(7): p. 1050-8.
206. Marzec, M., et al., *Oncogenic kinase NPM/ALK induces through STAT3 expression of immunosuppressive protein CD274 (PD-L1, B7-H1)*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(52): p. 20852-7.
207. Kozako, T., et al., *PD-1/PD-L1 expression in human T-cell leukemia virus type 1 carriers and adult T-cell leukemia/lymphoma patients*. *Leukemia*, 2009. **23**(2): p. 375-82.
208. Grzywnowicz, M., et al., *Programmed death-1 and its ligand are novel immunotolerant molecules expressed on leukemic B cells in chronic lymphocytic leukemia*. *PLoS One*, 2012. **7**(4): p. e35178.
209. Alizadeh, A.A., et al., *Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling*. *Nature*, 2000. **403**(6769): p. 503-11.
210. Yamamoto, R., et al., *PD-1/PD-L1 ligand interaction contributes to immunosuppressive microenvironment of Hodgkin lymphoma*. *Blood*, 2008. **111**(6): p. 3220-4.
211. Yamamoto, R., et al., *B7-H1 expression is regulated by MEK/ERK signaling pathway in anaplastic large cell lymphoma and Hodgkin lymphoma*. *Cancer Sci*, 2009. **100**(11): p. 2093-100.
212. Green, M.R., et al., *Integrative analysis reveals selective 9p24.1 amplification, increased PD-1 ligand expression, and further induction via JAK2 in nodular sclerosing Hodgkin lymphoma and primary mediastinal large B-cell lymphoma*. *Blood*, 2010. **116**(17): p. 3268-77.
213. Green, M.R., et al., *Constitutive AP-1 activity and EBV infection induce PD-L1 in Hodgkin lymphomas and posttransplant lymphoproliferative disorders: implications for targeted therapy*. *Clin Cancer Res*, 2012. **18**(6): p. 1611-8.
214. Iwai, Y., et al., *Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(19): p. 12293-7.
215. Kuranda, K., et al., *A subpopulation of malignant CD34+CD138+B7-H1+ plasma cells is present in multiple myeloma patients*. *Exp Hematol*, 2010. **38**(2): p. 124-31.
216. Bao, H., et al., *Triggering of toll-like receptor-4 in human multiple myeloma cells promotes proliferation and alters cell responses to immune and chemotherapy drug attack*. *Cancer Biol Ther*, 2011. **11**(1): p. 58-67.
217. Benson, D.M., Jr., et al., *The PD-1/PD-L1 axis modulates the natural killer cell versus multiple myeloma effect: a therapeutic target for CT-011, a novel monoclonal anti-PD-1 antibody*. *Blood*, 2010. **116**(13): p. 2286-94.
218. Salih, H.R., et al., *The role of leukemia-derived B7-H1 (PD-L1) in tumor-T-cell interactions in humans*. *Exp Hematol*, 2006. **34**(7): p. 888-94.
219. Chen, X., et al., *Clinical significance of B7-H1 (PD-L1) expression in human acute leukemia*. *Cancer Biol Ther*, 2008. **7**(5): p. 622-7.
220. Zhou, Q., et al., *Program death-1 signaling and regulatory T cells collaborate to resist the function of adoptively transferred cytotoxic T lymphocytes in advanced acute myeloid leukemia*. *Blood*, 2010. **116**(14): p. 2484-93.
221. Zhang, L., T.F. Gajewski, and J. Kline, *PD-1/PD-L1 interactions inhibit antitumor immune responses in a murine acute myeloid leukemia model*. *Blood*, 2009. **114**(8): p. 1545-52.
222. Mumprecht, S., et al., *Programmed death 1 signaling on chronic myeloid leukemia-specific T cells results in T-cell exhaustion and disease progression*. *Blood*, 2009. **114**(8): p. 1528-36.
223. Matte-Martone, C., et al., *Graft-versus-leukemia (GVL) against mouse blast-crisis chronic myelogenous leukemia (BC-CML) and chronic-phase chronic myelogenous leukemia (CP-CML)*:

- shared mechanisms of T cell killing, but programmed death ligands render CP-CML and not BC-CML GVL resistant.* J Immunol, 2011. **187**(4): p. 1653-63.
224. Koestner, W., et al., *PD-L1 blockade effectively restores strong graft-versus-leukemia effects without graft-versus-host disease after delayed adoptive transfer of T-cell receptor gene-engineered allogeneic CD8+ T cells.* Blood, 2011. **117**(3): p. 1030-41.
225. Asakura, S., et al., *Alloantigen expression on non-hematopoietic cells reduces graft-versus-leukemia effects in mice.* J Clin Invest, 2010. **120**(7): p. 2370-8.
226. Norde, W.J., et al., *PD-1/PD-L1 interactions contribute to functional T-cell impairment in patients who relapse with cancer after allogeneic stem cell transplantation.* Cancer Res, 2011. **71**(15): p. 5111-22.
227. Hobo, W., et al., *siRNA silencing of PD-L1 and PD-L2 on dendritic cells augments expansion and function of minor histocompatibility antigen-specific CD8+ T cells.* Blood, 2010. **116**(22): p. 4501-11.
228. Wilcox, R.A., et al., *B7-H1 (PD-L1, CD274) suppresses host immunity in T-cell lymphoproliferative disorders.* Blood, 2009. **114**(10): p. 2149-58.
229. Muhlbauer, M., et al., *PD-L1 is induced in hepatocytes by viral infection and by interferon-alpha and -gamma and mediates T cell apoptosis.* J Hepatol, 2006. **45**(4): p. 520-8.
230. Selenko-Gebauer, N., et al., *B7-H1 (programmed death-1 ligand) on dendritic cells is involved in the induction and maintenance of T cell anergy.* J Immunol, 2003. **170**(7): p. 3637-44.
231. Probst, H.C., et al., *Resting dendritic cells induce peripheral CD8+ T cell tolerance through PD-1 and CTLA-4.* Nat Immunol, 2005. **6**(3): p. 280-6.
232. Tsushima, F., et al., *Interaction between B7-H1 and PD-1 determines initiation and reversal of T-cell anergy.* Blood, 2007. **110**(1): p. 180-5.
233. Goldberg, M.V., et al., *Role of PD-1 and its ligand, B7-H1, in early fate decisions of CD8 T cells.* Blood, 2007. **110**(1): p. 186-92.
234. Barber, D.L., et al., *Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection.* Nature, 2006. **439**(7077): p. 682-7.
235. Trautmann, L., et al., *Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction.* Nat Med, 2006. **12**(10): p. 1198-202.
236. Hirano, F., et al., *Blockade of B7-H1 and PD-1 by monoclonal antibodies potentiates cancer therapeutic immunity.* Cancer Res, 2005. **65**(3): p. 1089-96.
237. Blank, C., et al., *PD-L1/B7H-1 inhibits the effector phase of tumor rejection by T cell receptor (TCR) transgenic CD8+ T cells.* Cancer Res, 2004. **64**(3): p. 1140-5.
238. Azuma, T., et al., *B7-H1 is a ubiquitous antiapoptotic receptor on cancer cells.* Blood, 2008. **111**(7): p. 3635-43.
239. Geng, L., et al., *B7-H1 expression is upregulated in peripheral blood CD14+ monocytes of patients with chronic hepatitis B virus infection, which correlates with higher serum IL-10 levels.* J Viral Hepat, 2006. **13**(11): p. 725-33.
240. Trabattoni, D., et al., *B7-H1 is up-regulated in HIV infection and is a novel surrogate marker of disease progression.* Blood, 2003. **101**(7): p. 2514-20.
241. Krupnick, A.S., et al., *Murine vascular endothelium activates and induces the generation of allogeneic CD4+25+Foxp3+ regulatory T cells.* J Immunol, 2005. **175**(10): p. 6265-70.
242. Sharma, M.D., et al., *Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase.* J Clin Invest, 2007. **117**(9): p. 2570-82.
243. Han, Y., et al., *Malignant B cells induce the conversion of CD4+CD25- T cells to regulatory T cells in B-cell non-Hodgkin lymphoma.* PLoS One, 2011. **6**(12): p. e28649.
244. Rosenblatt, J., et al., *PD-1 blockade by CT-011, anti-PD-1 antibody, enhances ex vivo T-cell responses to autologous dendritic cell/myeloma fusion vaccine.* J Immunother, 2011. **34**(5): p. 409-18.
245. Yang, Z.Z., et al., *Intratatumoral CD4+CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression of infiltrating CD4+ T cells in B-cell non-Hodgkin lymphoma.* Blood, 2006. **107**(9): p. 3639-46.

246. Bretscher, P. and M. Cohn, *A theory of self-nonself discrimination*. Science, 1970. **169**(3950): p. 1042-9.
247. Pulko, V., et al., *B7-h1 expressed by activated CD8 T cells is essential for their survival*. J Immunol, 2011. **187**(11): p. 5606-14.
248. Park, J.J., et al., *B7-H1/CD80 interaction is required for the induction and maintenance of peripheral T-cell tolerance*. Blood, 2010. **116**(8): p. 1291-8.
249. Uhr, J.W. and R. Marches, *Dormancy in a model of murine B cell lymphoma*. Semin Cancer Biol, 2001. **11**(4): p. 277-83.
250. Saudemont, A., et al., *Gene transfer of CD154 and IL12 cDNA induces an anti-leukemic immunity in a murine model of acute leukemia*. Leukemia, 2002. **16**(9): p. 1637-44.
251. Saudemont, A., et al., *NK cells that are activated by CXCL10 can kill dormant tumor cells that resist CTL-mediated lysis and can express B7-H1 that stimulates T cells*. Blood, 2005. **105**(6): p. 2428-35.
252. Saudemont, A., et al., *Dormant tumor cells develop cross-resistance to apoptosis induced by CTLs or imatinib mesylate via methylation of suppressor of cytokine signaling 1*. Cancer Res, 2007. **67**(9): p. 4491-8.
253. Liu, H., et al., *B7-H3 silencing increases paclitaxel sensitivity by abrogating Jak2/Stat3 phosphorylation*. Mol Cancer Ther, 2011. **10**(6): p. 960-71.
254. Cao, Y., et al., *Immunoregulatory molecule B7-H1 (CD274) contributes to skin carcinogenesis*. Cancer Res, 2011. **71**(14): p. 4737-41.
255. Lob, S., et al., *Levo- but not dextro-1-methyl tryptophan abrogates the IDO activity of human dendritic cells*. Blood, 2008. **111**(4): p. 2152-4.
256. Prendergast, G.C., *Immune escape as a fundamental trait of cancer: focus on IDO*. Oncogene, 2008. **27**(28): p. 3889-900.
257. Metz, R., et al., *Novel tryptophan catabolic enzyme IDO2 is the preferred biochemical target of the antitumor indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitory compound D-1-methyl-tryptophan*. Cancer Res, 2007. **67**(15): p. 7082-7.
258. Ball, H.J., et al., *Characterization of an indoleamine 2,3-dioxygenase-like protein found in humans and mice*. Gene, 2007. **396**(1): p. 203-13.
259. Taylor, M.W. and G.S. Feng, *Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism*. FASEB J, 1991. **5**(11): p. 2516-22.
260. Babcock, T.A. and J.M. Carlin, *Transcriptional activation of indoleamine dioxygenase by interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha in interferon-treated epithelial cells*. Cytokine, 2000. **12**(6): p. 588-94.
261. Fujigaki, S., et al., *Lipopolysaccharide induction of indoleamine 2,3-dioxygenase is mediated dominantly by an IFN-gamma-independent mechanism*. Eur J Immunol, 2001. **31**(8): p. 2313-8.
262. Mellor, A.L. and D.H. Munn, *IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(10): p. 762-74.
263. Puccetti, P. and U. Grohmann, *IDO and regulatory T cells: a role for reverse signalling and non-canonical NF-kappaB activation*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(10): p. 817-23.
264. Munn, D.H., et al., *Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism*. Science, 1998. **281**(5380): p. 1191-3.
265. Frumento, G., et al., *Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase*. J Exp Med, 2002. **196**(4): p. 459-68.
266. Fallarino, F., et al., *T cell apoptosis by tryptophan catabolism*. Cell Death Differ, 2002. **9**(10): p. 1069-77.
267. Bauer, T.M., et al., *Studying the immunosuppressive role of indoleamine 2,3-dioxygenase: tryptophan metabolites suppress rat allogeneic T-cell responses in vitro and in vivo*. Transpl Int, 2005. **18**(1): p. 95-100.

268. Fallarino, F., 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, 2006. **176**(11): p. 6752-61.
269. Yoshida, R. and O. Hayaishi, *Induction of pulmonary indoleamine 2,3-dioxygenase by intraperitoneal injection of bacterial lipopolysaccharide.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1978. **75**(8): p. 3998-4000.
270. Yoshida, R., et al., *Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase in mouse lung during virus infection.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(8): p. 4084-6.
271. Bozza, S., et al., *A crucial role for tryptophan catabolism at the host/Candida albicans interface.* J Immunol, 2005. **174**(5): p. 2910-8.
272. Romani, L., et al., *IL-17 and therapeutic kynurenines in pathogenic inflammation to fungi.* J Immunol, 2008. **180**(8): p. 5157-62.
273. Zhu, L., et al., *Synovial autoreactive T cells in rheumatoid arthritis resist IDO-mediated inhibition.* J Immunol, 2006. **177**(11): p. 8226-33.
274. Laurence, J.M., et al., *Blocking indoleamine dioxygenase activity early after rat liver transplantation prevents long-term survival but does not cause acute rejection.* Transplantation, 2008. **85**(9): p. 1357-61.
275. Cook, C.H., et al., *Spontaneous renal allograft acceptance associated with "regulatory" dendritic cells and IDO.* J Immunol, 2008. **180**(5): p. 3103-12.
276. Guillonneau, C., et al., *CD40lg treatment results in allograft acceptance mediated by CD8CD45RC T cells, IFN-gamma, and indoleamine 2,3-dioxygenase.* J Clin Invest, 2007. **117**(4): p. 1096-106.
277. Grohmann, U., et al., *CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo.* Nat Immunol, 2002. **3**(11): p. 1097-101.
278. Jasperson, L.K., et al., *Indoleamine 2,3-dioxygenase is a critical regulator of acute graft-versus-host disease lethality.* Blood, 2008. **111**(6): p. 3257-65.
279. Munn, D.H. and A.L. Mellor, *Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance.* J Clin Invest, 2007. **117**(5): p. 1147-54.
280. Okamoto, A., et al., *Indoleamine 2,3-dioxygenase serves as a marker of poor prognosis in gene expression profiles of serous ovarian cancer cells.* Clin Cancer Res, 2005. **11**(16): p. 6030-9.
281. Brandacher, G., et al., *Prognostic value of indoleamine 2,3-dioxygenase expression in colorectal cancer: effect on tumor-infiltrating T cells.* Clin Cancer Res, 2006. **12**(4): p. 1144-51.
282. Munn, D.H., et al., *Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase.* Science, 2002. **297**(5588): p. 1867-70.
283. Corm, S., et al., *Indoleamine 2,3-dioxygenase activity of acute myeloid leukemia cells can be measured from patients' sera by HPLC and is inducible by IFN-gamma.* Leuk Res, 2009. **33**(3): p. 490-4.
284. Chamuleau, M.E., et al., *High INDO (indoleamine 2,3-dioxygenase) mRNA level in blasts of acute myeloid leukemic patients predicts poor clinical outcome.* Haematologica, 2008. **93**(12): p. 1894-8.
285. Marshall, N.A., et al., *Immunosuppressive regulatory T cells are abundant in the reactive lymphocytes of Hodgkin lymphoma.* Blood, 2004. **103**(5): p. 1755-62.
286. Kordasti, S.Y., et al., *CD4+CD25high Foxp3+ regulatory T cells in myelodysplastic syndrome (MDS).* Blood, 2007. **110**(3): p. 847-50.
287. Curti, A., et al., *Acute myeloid leukemia cells constitutively express the immunoregulatory enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase.* Leukemia, 2007. **21**(2): p. 353-5.
288. Muller, A.J., et al., *Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase, an immunoregulatory target of the cancer suppression gene Bin1, potentiates cancer chemotherapy.* Nat Med, 2005. **11**(3): p. 312-9.
289. Chambers, S.M., et al., *Aging hematopoietic stem cells decline in function and exhibit epigenetic dysregulation.* PLoS Biol, 2007. **5**(8): p. e201.

290. Brahmer, J.R., et al., *Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer*. N Engl J Med, 2012. **366**(26): p. 2455-65.
291. Topalian, S.L., et al., *Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer*. N Engl J Med, 2012. **366**(26): p. 2443-54.

UNIVERSITE DE LILLE II

Ecole Doctorale Biologie et Santé de Lille

THESE

Présentée pour l'obtention du grade de :

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE II

NOM : BERTHON

Prénom : Céline

Titre thèse : Mécanismes d'immunoévasion dans les leucémies aiguës myéloïdes : la molécule B7-H1.

Mots-clés :

Leucémie aigüe myéloïde, B7-H1, immunoévasion, MEK, TLR, IFN- γ

Résumé :

Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) restent des pathologies au pronostic sombre en raison d'une incidence fréquente de rechutes. Les mécanismes d'immunoévasion impliqués dans les LAM sont très divers. Nous avons étudié l'implication de la molécule B7-H1 (PD-L1), une molécule de co stimulation impliquée dans la résistance des cellules tumorales aux lymphocytes cytotoxiques et identifiée précédemment par notre équipe comme facteur de dormance tumorale, dans ces mécanismes.

Sur une série de 79 LAM au diagnostic ou en rechute, l'expression de B7-H1 a été retrouvée chez 18% des patients. Il n'existe pas de corrélation entre l'expression de cette molécule et les paramètres cliniques. Une induction de l'expression après stimulation par l'IFN- γ et les ligands des TLR 2 et 4 présents à la surface des blastes est par contre identifiée dans une large proportion des LAM. Cette augmentation de l'expression de B7-H1 entraîne une diminution de la lyse des blastes par les lymphocytes T cytotoxiques (CTLs). La voie de signalisation MEK est essentielle dans l'expression de la molécule B7-H1 et son blocage pharmacologique permet de resensibiliser les blastes aux CTLs. Nous explorons par ailleurs un rôle direct de B7-H1 dans la chimiorésistance. Ainsi B7-H1 pourrait se révéler une molécule aux effets multiples dans les hémopathies malignes, contribuant à la fois aux échecs primaires et à la dormance leucémique. Une dissection fine des mécanismes mis en jeu par B7-H1, et au delà d'autres molécules de la famille B7 ouvrirait des potentialités thérapeutiques intéressantes, à l'heure où plusieurs anticorps anti-B7-H1 et anti-PD-1 de grades cliniques sont en essais dans les tumeurs solides.