Optimisation d'une stratégie thérapeutique antitumorale conventionnelle par association à une immunothérapie : etude de phase I combinant l'Imatinib à l'Interleukine-2

Clara Locher

▶ **To cite this version:**

Clara Locher. Optimisation d'une stratégie thérapeutique antitumorale conventionnelle par association à une immunothérapie : etude de phase I combinant l'Imatinib à l'Interleukine-2. Immunologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2013. Français. NNT : 2013PA11T027 . tel-00920831

HAL Id: tel-00920831
https://theses.hal.science/tel-00920831

Submitted on 19 Dec 2013

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

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

UNIVERSITE PARIS-SUD

THESE

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS-SUD

Champ disciplinaire : Oncologie-Immunologie

Ecole doctorale de rattachement : Cancérologie, Biologie, Médecine, Santé

Présentée et soutenue publiquement par

Clara Amandine LOCHER

Le 07 juin 2013

Optimisation d'une stratégie thérapeutique antitumorale conventionnelle par association à une immunothérapie : Etude de phase I combinant l'Imatinib à l'Interleukine-2

Directeur de thèse : Pr. Laurence ZITVOGEL
Co-directeur de thèse : Dr. Nathalie CHAPUT

Composition du jury :

Président du jury	Pr. Pierre GALANAUD
Rapporteur	Pr. Eric TARTOUR
Rapporteur	Dr. Christine MENETRIER-CAUX
Examinateur	Pr. Alain PUISIEUX
Examinateur	Pr. Julien TAIEB

N'essayez pas de devenir un homme qui a du succès.
Essayez de devenir un homme qui a de la valeur.

Albert Einstein

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, j'adresse mes remerciements à tous les membres de mon jury de thèse, qui ont apporté leur jugement éclairé à ce travail. Je remercie sincèrement mes rapporteurs, le professeur ***Eric Tartour*** et le docteur ***Christine Ménétrier-Caux***, pour leur travail de relecture attentive de ce manuscrit et l'ensemble des retours qu'ils m'ont fournis. Je remercie également le professeur ***Pierre Galanaud***, le professeur ***Julien Taieb*** et le professeur ***Alain Puisieux*** d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse.

Je tiens à remercier ma directrice de thèse, le professeur ***Laurence Zitvogel***, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire. L'occasion me fut ainsi donnée d'affronter la rigueur dont vous ne vous départissiez jamais. Même si elle est parfois source de difficultés, elle reste surtout pour moi une école à laquelle chacun gagne à être formé.

Je remercie affectueusement le docteur ***Nathalie Chaput*** pour la qualité de son encadrement scientifique et son talent. Merci pour tes conseils avisés qui m'ont fait progresser dans mon travail de recherche. Il m'est aussi agréable de t'adresser un grand merci pour ta disponibilité et ta gentillesse et j'espère avoir l'occasion de faire de nombreux autres congrès en ta compagnie.

Je pense également au docteur ***Angelo Paci*** qui mérite une place de choix dans ces remerciements. Travailler à tes côtés est un réel plaisir et j'espère sincèrement pouvoir le faire encore longtemps.

Je souhaite aussi témoigner ma sincère reconnaissance au professeur ***Alain Puisieux***. Vous avez marqué mon parcours d'étudiante puisque c'est après un stage de quelques semaines au sein de votre laboratoire que j'ai décidé de me lancer dans la grande aventure qu'est la recherche. Un peu à l'image de l'effet papillon, cette initiation à la recherche a contribué à m'ouvrir les portes de l'Ecole Normale Supérieure, puis du master, puis de la thèse et j'en suis sûre, continuera à m'ouvrir bien d'autres portes. Alors tout simplement, merci.

Mes remerciements vont ensuite à ma famille, à mes amis et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'aboutissement de ce travail. A mes frères et sœur, ***Emmanuel***, ***Viviane*** et ***Florian***, chacun à votre manière vous m'apportez un soutien irremplaçable et inconditionnel. J'ai hâte de passer plus de temps avec vous et aussi avec mon adorable belle-sœur ***Christine***, ***Nicolas*** et ***Laurène*** qui ont agrandi la fratrie. ***Hélène***, ma Chouki, ma PaonPaon, si je devais définir l'amitié, ça serait toi. Et peu importante la distance ou le temps

qui passe, je sais que rien ne changera cela. Merci pour tout. ***Sylvie***, ma Rusa, ma Królika, ma soupape, ma bouée de sauvetage, merci pour ta force, pour ton soutien, pour ton aide, pour ton rire tellement contagieux, pour tous ces bons moments passés ensembles et aussi pour tous ceux à venir. ***Caroline*** et ***Michaella***, merci pour votre bonne humeur, pour votre présence apaisante et rassurante en toute circonstance. ***Fanélie***, merci pour nos séances de squash libératrices, pour nos maxi-cookies, pour ces heures passées en terrasse, pour nos discussions de tout, de rien, de nous, des autres... Merci pour tous ces moments de détentes si nécessaires et toujours agréables. Je te souhaite plein de courage et tout le meilleur pour ta thèse et le reste. Je remercie aussi ***Lauriane*** et ***Antoine*** d'avoir répondu présent chaque fois que j'ai eu besoin de me changer les idées. Merci pour les apéroofs, les terrasses, les pintes, les grecs à pas d'heure, les vacances au soleil, les Dodo lé là. Merci à ***Gianni*** de m'avoir permis de réaliser cette petite folie qu'est prendre l'avion comme on prend un métro. Dans la liste des choses à faire « sans plus attendre », je devais passer ma thèse et toi, grimper un col hors-catégorie. Je crois pouvoir dire que c'est ton tour… Je remercie ***Maxime*** pour sa patience et pour n'avoir trop rien dit chaque que je me suis levée aux aurores. Je pense aussi à ***Marie-Eve***, ***Caroline***, ***Nanou***, ***Muriel***, ***Agnès***, ***Julie***, ***Vincent***, ***Capucine***, ***Eric***, ***Jeanne***, les poissons et tant d'autres avec qui je ne passe pas autant de temps que je le souhaiterais. J'ai hâte de voir…

Je ne saurai finir sans remercier mes parents qui m'ont donné les moyens d'accomplir ce travail dans les meilleures conditions. Mais surtout, ***Papa***, ***Maman***, je vous remercie de m'avoir transmis cette force incroyable de savoir que rien n'est impossible. Merci de m'avoir soutenu en toute circonstance, et de n'avoir jamais douté de moi.

A mes neveux,
Jules, ***Corentin***, ***Elouan*** et ***Antoine***,
parce qu'un seul de vos sourires,
un seul de vos « Tatiiiii »,
suffisent à me remplir d'une énergie débordante.

A mes grands-parents
dont les encouragements
et l'affection me sont si précieux.

RESUME

Chef de file des inhibiteurs de tyrosine kinase, l'Imatinib Mesylate (IM) a révolutionné la prise en charge de la leucémie myéloïde chronique et des tumeurs stromales gastro-intestinales. En plus de son action directe sur les cellules tumorales, une partie de l'efficacité thérapeutique de l'IM a été attribuée à son aptitude à moduler la réponse immunitaire. Cette propriété soulève la possibilité que les résultats cliniques de l'IM pourraient être améliorés en le combinant efficacement à une immunothérapie. A cet effet, nous avons montré dans un modèle préclinique que l'interleukine-2 (IL-2) – adjuvant des cellules NK – augmente l'efficacité de l'IM. Nous avons également démontré une efficacité supérieure de l'IM en association au cyclophosphamide (CTX) du fait de l'inhibition des lymphocytes T régulateurs. Nous avons donc entrepris un essai clinique de phase 1 associant l'IM, l'IL-2 et le CTX chez des patients ayant une tumeur solide métastatique ou localement avancée. Les objectifs de cet essai sont (i) de déterminer la dose maximale tolérée d'IL-2 associée à l'IM et au CTX ; (ii) d'étudier les paramètres pharmacocinétiques de l'association ; (iii) d'évaluer l'efficacité de l'association et (iv) son effet sur les effecteurs de l'immunité. Au total, 17 patients ont été inclus dans cette étude. La DMT d'IL-2 associée à la dose fixe de 400 mg d'IM correspond à 6 MUI/j. A ce niveau de dose, tous les patients ont présenté au moins un effet indésirable imputable au traitement : principalement fièvre et frissons, augmentation des enzymes hépatiques, asthénie et nausée mais sans que ne soit observée de toxicité limitante. L'étude des paramètres pharmacocinétiques révèle une augmentation significative de l'exposition systémique à l'IM en fin de cycle et qui semble être imputable à l'IL-2. La pharmacocinétique de l'IL-2 n'est par contre pas modifiée par l'administration concomitante d'IM. Sur le plan des effecteurs de l'immunité, l'association IM, IL-2 et CTX diminue le taux de lymphocytes B, lymphocytes T (LT) $CD4^+$ et LT $CD8^+$ mais active les cellules NK puisqu'on observe une augmentation des marqueurs $CD56^{bright}$, HLA-DR et TRAIL. De manière intéressante, la sous-population de cellules NK HLA-DR^+ possède des capacités de dégranulation plus importantes après exposition à cette association et son expansion est associée à une meilleure survie. Cette association pourrait donc s'avérer particulièrement intéressante dans le traitement de tumeurs sensibles d'une part à l'IM et d'autre part à la lyse par les cellules NK. Les GIST étant particulièrement sensibles à l'IM, nous avons étudié l'infiltrat tumoral présent au niveau de ses tumeurs. Nous avons ainsi pu mettre en évidence le rôle pronostique de l'infiltrat en LT et NK sur la survie sans progression des GIST. En vue d'une étude de phase 2, les GIST apparaissent donc être un modèle tumoral particulièrement pertinent pour évaluer les bénéfices de l'association IM, IL-2 et CTX.

ABSTRACT

Imatinib mesylate (IM) was the first tyrosine kinase inhibitor to be successfully used in clinical practice and its introduction has revolutionized the management of chronic myeloid leukemia and gastrointestinal stromal tumors. In addition to its direct effects on malignant cells, IM appears to exert immunological off-target effects that contribute to its anticancer effects. Thus, combining IM with immunotherapy might improve patients' clinical outcome. Indeed, IM combined to Interleukin-2 (IL-2) - a cytokine that enhances natural killer (NK) cells functions - improved antitumor responses in preclinical models. We also observed synergistic effects of cyclophosphamide (CTX) and IM as a result of the inhibition of regulatory T lymphocytes. Based on the promising results of these preclinical studies, we developed a phase 1 clinical trial which combines metronomic CTX, IM and escalating doses of IL-2 in patients affected by refractory solid tumors. The goals of this study were (i) to determine the maximum tolerated dose of IL-2 combined with IM and CTX ; (ii) to study the pharmacokinetics of IM and IL-2 ; (iii) to evaluate clinical efficacy of the combined therapy and (iv) effects of the association on immune parameters. A total of 17 patients were enrolled in the study. The maximum tolerated dose of IL-2 combined with IM, given at a constant dose of 400 mg was determined to be 6 MIU/day. At this dose level, all patients experienced at least one treatment-related adverse event: fevers and chills, transaminase elevation, fatigue and nausea but no dose-limiting toxicities were observed. Pharmacokinetic studies revealed that the the co-administration of IL-2 increases the systemic exposure of patients to IM. In contrast, the pharmacokinetics of IL-2 was not modified by IM. The combined therapy markedly reduced the absolute numbers of B lymphocytes, $CD4^+$ T cells and $CD8^+$ T cells in a IL-2 dose-dependant manner. The NK cell compartment was activated, exhibiting a significant upregulation of $CD56^{bright}$, HLA-DR and TRAIL. Interinstingly, the abundance of HLA-DR+ NK cells after one course of combined therapy positively correlated with both progression free- and overall survival. Thus, it could be of interest to evaluate this immunotherapeutic regimen in a tumor model sensitive to IM and to lysis by NK cells and evaluate whether the adjunction of IL-2 can boost the efficacy of IM. GIST are particularly sensitive to IM, thus we performed a retrospective study of the immune infiltrates and their prognostic value in these tumors. We found that both LT and NK cell infiltrates were independent prognostic factors for progression-free survival. For a phase 2 clinical trial, gastrointestinal stromal tumors appear to be a particularly relevant to evaluate the benefits of the association IM, IL-2 and CTX.

ABREVIATIONS

ADCC : *antibody dependent cell-mediated cytotoxicity*

ADCP : *antibody dependent cell-mediated phagocytosis*

BCRP : *Breast cancer resistance protein*

CCL : *chemokine (C-C motif) ligand*

CDC : *complement dependent cytotoxicity*

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CTCAE : *common terminology criteria for adverse events*

CTX : cyclophosphamide

CXCL : *chemokine (C-X-C motif) ligand*

CXCR : *chemokine (C-X-C motif) receptor*

DC : *dendritic cell*

DFSP : *dermatofibrosarcoma protuberans*

DMT : dose maximale tolérée

EGFR : *epidermal growth factor receptor*

FasL : *Fas ligand*

FDA : *Food and Drug Administration*

FOXP3 : *forkhead box P3*

GITR : *glucocorticoid induced TNF receptor related protein*

GIST : *Gastrointestinal Stromal Tumors*

HER2 : *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*

HSP : *heat shock proteins*

IDO : indoléamine 2,3-dioxygénase

IFN : interféron

IKDC : *interferon producing killer dendritic cells*

IL : interleukine

IM : imatinib mésylate

KIR : *killer-cell immunoglobulin-like receptor*

LB : lymphocyte B

LMC : leucémie myéloïde chronique

LT : lymphocyte T

MCA : méthylcholantrène

M-CSFR : *macrophage colony-stimulating factor receptor*

MDSC : *myeloid-derived suppressor cells*

MICA : *soluble major histocompatibility complex class I-related chain A protein)*

NK : *natural killer cell*

NKG2D : *Natural killer group 2, member D*

NKT : *natural killer T cell*

PDGF : *platelet derived growth factor*

PDGFR : *platelet derived growth factor receptor*

PD-L2 : *programmed death receptor-ligand 2*

P-gp : glycoprotéine P

RAG : *recombinase activator gene*

SHE : syndrome hyperéosinophilique

SCF : *stem cell factor*

SCGF : *stem cell growth factor*

TAA : *tumor-associated antigen*

TAM : *tumor-associated macrophages*

TGF : *transforming growth factor*

TLR : *toll-like receptor*

TNF-α : *tumor necrosis factor alpha*

TRAIL : *TNF-related apoptosis-inducing ligand*

Treg : lymphocyte T régulateur

VEGF : *vascular endothelial growth factor*

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS 3

RESUME 5

ABSTRACT 6

ABREVIATIONS 7

SOMMAIRE 8

PREAMBULE 10

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE 12

IMPORTANCE DU SYSTEME IMMUNITAIRE EN CANCEROLOGIE 12

Le concept d'immunosurveillance antitumorale 12

Nature des réponses immunitaires antitumorales efficaces 13

Immunosurveillance antitumorale chez l'homme 15

L'échappement des tumeurs au système immunitaire 19

Immunosélection 19

Immunosubversion 20

La théorie de l'immunoediting 22

La théorie de la tolérance 24

IMMUNOTHERAPIE ANTITUMORALE 25

Principales stratégies d'immunothérapie antitumorale 25

Immunothérapie non spécifique 25

Immunothérapie par les anticorps monoclonaux 25

Immunothérapie adoptive 27

Immunothérapie spécifique active 28

Vers une optimisation des protocoles d'immunothérapie antitumorale 29

Cancers à des stades précoces 29

Inhiber l'immunosuppression associée aux tumeurs 30

Associer immunothérapie et approches antitumorales conventionnelles 30

RELATIONS ENTRE SYSTEME IMMUNITAIRE ET TRAITEMENTS ANTITUMORAUX 32

Effets synergiques des chimiothérapies et du système immunitaire 32

Immunogénicité de la mort cellulaire 34

Recrutements de lymphocytes T γδ 35

Elimination sélective de populations immunosuppressives 35

Immunomodulation par les thérapies ciblées 36

EFFETS IMMUNOMODULATEURS DE L'IMATINIB 39

Développement de l'Imatinib 39

Autres cibles moléculaires de l'Imatinib 40

Indications thérapeutiques de l'Imatinib 41

Leucémie myéloïde chronique 41

Tumeurs stromales gastro-intestinales 41

Syndrome hyperéosinophilique 44
Dermatofibrosarcoma protuberans 44
Imatinib : un développement clinique sans précédent 45
Imatinib et immunomodulation 46
Observations cliniques 46
Imatinib et hématopoïèse 48
Imatinib et cellules présentatrices d'antigène 48
Effets de l'Imatinib sur les fonctions lymphocytaires 49
Effets de l'Imatinib sur les lymphocytes T régulateurs 51
Effets de l'Imatinib sur les fonctions NK 51
Cibles de l'Imatinib 52
Imatinib et immunothérapie 53
RATIONNEL D'UN TRAITEMENT PAR L'ASSOCIATION IM ET IL-2 54
Cancer et cellules NK 54
Imatinib et dialogue NK/DC 56
Interleukine-2 : adjuvant des NK 56
Efficacité de l'association Imatinib / Interleukine-2 57
IKDC : *interféron producing killer dendritic cells* 57
Essai clinique de phase I : IMAIL-2 59
Traitements et posologies à l'étude 59
OBJECTIFS 61
MATERIEL ET METHODES 62
ESSAI CLINIQUE DE PHASE 1 : IMAIL-2 62
ANALYSE PHENOTYPIQUE ET FONCTIONNELLES DES CELLULES INFILTRANT LES GIST .. 65
RESULTATS 67
ARTICLE 1 : PHASE I CLINICAL TRIAL COMBINING IM AND IL-2 IN REFRACTORY CANCER PATIENTS: IL-2 INTERFERES IN THE PHARMACOKINETICS OF IM 67
ARTICLE 2 : PHASE I CLINICAL TRIAL COMBINING IM AND IL-2: HLA-DR$^+$ NK CELL LEVELS CORRELATE WITH DISEASE OUTCOME 79
ARTICLE 3 : IMMUNE INFILTRATES ARE PROGNOSTIC FACTORS IN LOCALIZED GIST 91
Caractérisation de l'infiltrat GIST 91
Effets de l'IM sur l'infiltrat GIST 92
NK, LT et pronostic des GIST localisées 93
DISCUSSION 134
CONCLUSION ET PERSPECTIVES 143
REFERENCES 145
ANNEXES 164

PREAMBULE

Au cours des deux dernières décennies, la prise en charge du cancer a évolué de manière spectaculaire, notamment grâce à l'avènement des thérapies moléculaires ciblées et des immunothérapies antitumorales. Les progrès réalisés en biologie moléculaire et en immunologie ont en effet favorisé la découverte et la validation de molécules innovantes, plus efficaces et moins nocives que les chimiothérapies classiques.

Les thérapies moléculaires ciblées – regroupant les inhibiteurs de tyrosine kinase et les anticorps monoclonaux – agissent spécifiquement sur les cellules tumorales, en ciblant les mécanismes moléculaires essentiels à leur croissance et à leur survie. Utilisées en monothérapie, ces thérapeutiques permettent d'observer des taux de réponses parfois spectaculaires, comme c'est le cas pour l'Imatinib Mésylate (IM) qui induit une réponse cytogénétique complète chez 76% de patients atteints de leucémie myéloïde chronique. Leur efficacité antitumorale et leur excellent profil de tolérance ont ainsi permis aux thérapies moléculaires ciblées de rapidement devenir des standards thérapeutiques pour plusieurs affections néoplasiques. Malheureusement la plupart des tumeurs développent des mécanismes de résistance, et le bénéfice clinique de ces traitements reste limité dans le temps.

En parallèle du développement des thérapies moléculaires ciblées, le récent succès de l'Ipilimumab et du sipuleucel-T a permis de valider le concept d'immunothérapie antitumorale et a suscité un nouvel intérêt pour cette stratégie thérapeutique. Le sipuleucel-T, dont la commercialisation a été approuvée en 2010, constitue le premier vaccin cellulaire thérapeutique et améliore la survie globale des patients atteints de cancer de la prostate résistant à la castration. L'Ipilimumab, quant à lui, est un anticorps anti-CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte antigen*) qui a démontré son efficacité chez des patients atteints de mélanomes. Que ce soit avec l'Ipilimumab ou le sipuleucel-T, une réponse immunologique est souvent détectée chez les patients traités par ces immunothérapies antitumorales. Malheureusement, la réponse immune générée est bien souvent trop faible et peine à induire une efficacité clinique en terme de régression tumorale. Par contre, grâce à la génération de mémoire immunitaire antitumorale, les immunothérapies peuvent dans certains cas induire des réponses stables et durables.

Pour aller plus loin dans la prise en charge des cancers, il apparaît clairement nécessaire de rechercher et d'évaluer des combinaisons thérapeutiques plus efficaces. Plusieurs éléments laissent notamment penser que les thérapies moléculaires ciblées pourraient être efficacement combinés avec une immunothérapie. Parmi ces éléments, le fait que certaines thérapies moléculaires exercent, en parallèle de leur effet directement

cytotoxique sur les cellules tumorales, des effets immunostimulants constituent un argument fort en faveur d'une synergie entre thérapie ciblé et immunothérapie antitumorale.

Dans ce contexte, les questions adressées au cours de mon travail de thèse ont été d'une part de d'étudier les effets immunomodulateurs de l'IM, un inhibiteur de tyrosine kinase, et d'autre part d'évaluer l'intérêt de combiner l'IM à une immunothérapie par l'interleukine-2. Pour introduire ce sujet, seront donc abordé différents points dont l'importance du système immunitaire en cancérologie, les relations entre système immunitaire et traitements antitumoraux ainsi que les effets immunomodulateurs spécifiques à l'IM décrits dans la littérature. Seront ensuite présentés le rationnel scientifique nous ayant permis d'entreprendre un essai de phase 1 combinant l'IM, le cyclophosphamide et l'interleukine-2 puis les résultats obtenus au cours de cet essai clinique. Seront également présentés les résultats d'une étude visant à mieux caractériser les effets immunomodulateurs de l'IM dans un modèle de tumeur sensible à ce traitement : les tumeurs stromales gastro-intestinales.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Importance du système immunitaire en cancérologie

Le concept d'immunosurveillance antitumorale

Le système immunitaire comprend l'ensemble des mécanismes biologiques agissant conjointement pour protéger l'organisme d'agressions pathogènes, notamment extérieures (virales, bactériennes, parasitaires, fongiques). A coté de ce rôle protecteur vis-à-vis d'agressions d'origine extérieure, le système immunitaire semble également capable de reconnaitre des cellules du soi en voie de transformation cancéreuse, et d'éliminer précocement ces précurseurs avant que la tumeur ne devienne cliniquement décelable. Cette théorie dite « d'immunosurveillance », est apparue au début du XX^{ème} siècle avec les travaux de Paul Ehrlich. Ce principe, d'abord oublié pendant près de 50 ans, fit ensuite l'objet de nombreuses controverses. En effet, le manque de preuves expérimentales et l'observation selon laquelle les souris athymiques ne développaient pas plus de cancers induits que les souris immunocompétentes ont conduit au rejet de ce concept par la communauté scientifique.

C'est seulement dans les années 1990, avec l'avènement des modèles murins déficients et la production d'anticorps monoclonaux hautement spécifiques que le concept d'immunosurveillance a finalement pu être validé. Ces outils ont en effet permis de montrer que les souris présentant des déficits de différents acteurs de l'immunité sont plus sensibles au développement de cancers induits ou spontanés que les souris immunocompétentes (**Figure 1**).

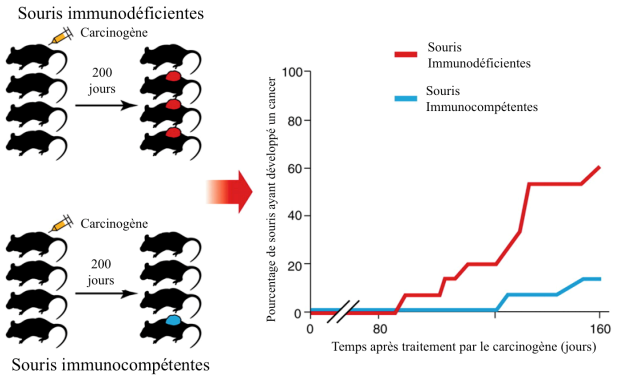


Figure 1 : Le statut immunitaire de la souris est un facteur déterminant lors du développement de tumeurs induites par des carcinogènes chimiques. Les souris immunodéficientes développent en effet plus de tumeurs que les souris immunocompétentes. D'après Schreiber *et al.*, 2011 [1].

Ces expériences menées sur des souris immunodéficientes ont conduit à reconnaître au système immunitaire un rôle majeur dans le contrôle de la prolifération des tumeurs. En parallèle, des études complémentaires sont venues enrichir la connaissance des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans l'immunosurveillance antitumorale.

Nature des réponses immunitaires antitumorales efficaces

A ce jour, il existe trois modèles murins, appropriés à l'examen de l'immunosurveillance antitumorale : les tumeurs induites par un carcinogène, les tumeurs spontanées qui surviennent lors du vieillissement et le développement de tumeurs chez des souris génétiquement prédisposées au cancer. Ainsi, il a été démontré dans ces modèles que divers types cellulaires, notamment les lymphocytes T (LT) αβ, LT γδ, les cellules NK (*natural killer*) et NKT (*natural killer* T) mais aussi les éosinophiles ainsi que les molécules effectrices perforine et TRAIL (*tumor necrosis factor-alpha related apoptosis-inducing ligand*), ou encore les cytokines interféron-gamma (IFN-γ) et interleukine (IL)-12 sont impliqués dans les processus d'élimination des tumeurs (**Tableau 1**).

Le processus d'élimination des cellules tumorales comprend donc l'activation de réponses immunitaires innées et adaptatives qui agissent selon différents mécanismes. Les cellules immunitaires peuvent avoir un effet directement cytotoxique sur les cellules tumorales. Le mécanisme de lyse des cellules tumorales repose sur les granules cytotoxiques de perforine/granzyme [1-3] ou bien sur des récepteurs membranaires de mort, tels que FasL (*Fas ligand*), TNF-α (*tumor necrosis factor-alpha*) ou TRAIL [4,5]. D'ailleurs, les souris déficientes pour des molécules impliquées dans ces mécanismes de lyse cellulaire développent plus de lymphomes spontanés [2,5].

Outre cette activité cytotoxique, les cellules NK, NKT et les LT peuvent produire des cytokines ayant une action antitumorale plus ou moins directe. Parmi ces cytokines, l'IFN-γ est reconnu depuis longtemps comme une cytokine majeure de l'immunité antitumorale naturelle [6]. Cette cytokine peut en effet avoir une action anti-prolifférative [7] ou pro-apoptotique [8] directe sur les cellules tumorales. De plus, l'IFN-γ augmente l'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I) sur les cellules tumorales et facilite ainsi leur reconnaissance par les LT $CD8^+$ effecteurs [6]. D'autres cytokines sont très importantes pour les réponses antitumorales naturelles, notamment les IFN de type I : IFN-α et β [9,10]. Dans un contexte tumoral, l'IFN-α/β est capable d'agir sur les cellules dendritiques (DC : *dendritic cell*) pour faciliter la présentation croisée des antigènes [11] ainsi que la genèse de réponses humorales [12]. De plus, l'IFN-α/β augmente la survie des LT activés [13] et favorise l'expression de TRAIL sur les cellules NK [14]. L'IFN-α/β peut aussi avoir un effet angiostatique, en limitant entre autres, la motilité des cellules endothéliales [15].

Tableau 1 : Incidence de cancers induits ou spontanés chez des souris présentant différents déficits immunitaires. D'après Vesely *et al*. 2011 [16].

Incidence de cancers induits chez des souris présentant différents déficits immunitaires			
Génotype	**Déficit immunitaire**	**Incidence de cancers induits**	**Réf.**
Rag1$^{-/-}$ ou *Rag2*$^{-/-}$	LT, LB et NKT	↑ sarcomes induits par le MCA	17, 18
SCID	LT, LB et NKT	↑ sarcomes induits par le MCA	17
Tcrb$^{-/-}$	LTαβ	↑ sarcomes induits par le MCA	19
Tcrd$^{-/-}$	LTγδ	↑ sarcomes induits par le MCA ↑ tumeurs cutanées induites par DMBA/TPA	19
Cd1d$^{-/-}$	Cellules T-dépendantes de CD1d	↑ sarcomes induits par le MCA	20
Ja18$^{-/-}$	NKT invariants	↑ sarcomes induits par le MCA	18, 21, 22
α asialo-GM1	NK	↑ sarcomes induits par le MCA	18, 21
Anti-NK1.1	NK et NKT	↑ sarcomes induits par le MCA	18, 21
Transgéniques RAE1	Signalisation NKG2D	↑ tumeurs induites par DMBA/TPA	23
Ccl11$^{-/-}$ *Il5*$^{-/-}$	Eosinophiles	↑ sarcomes induits par le MCA	24
Cd80$^{-/-}$ et *Cd86*$^{-/-}$	CD80 et CD86	↑ cancers induits par les UV	25
Ifng$^{-/-}$	IFN-γ	↑ sarcomes induits par le MCA ↑ tumeurs cutanées induites par le MCA ↑ lymphomes induits par le MNU	26-28
Ifngr1$^{-/-}$	Insensible à l'IFN-γ	↑ sarcomes induits par le MCA	6, 17
Ifnar1$^{-/-}$ ou *Ifnar2*$^{-/-}$	Pas de réponse aux IFN-α et IFN-β	↑ sarcomes induits par le MCA	9, 10
Stat1$^{-/-}$	Insensibilité à l'IFN-α, IFN-β, IFN-γ	↑ sarcomes induits par le MCA	6, 17
Pfp$^{-/-}$	Perforine	↑ sarcomes induits par le MCA	3, 26
Trail$^{-/-}$	TRAIL	↑ sarcomes induits par le MCA	4
Il12a$^{-/-}$	IL-12	↑ tumeurs cutanées induites par DMBA/TPA ↑ lymphomes induits par le MNU	27, 29
Incidence de cancers spontanés chez des souris présentant différents déficits immunitaires			
Rag2$^{-/-}$	LT, LB et NKT	↑ cancers intestinaux et pulmonaires	17
Rag2$^{-/-}$ *Stat1*$^{-/-}$	LT, LB et NKT Insensibilité à l'IFN-α, IFN-β, IFN-γ	↑ adénomes intestinaux ↑ adénocarcinomes du colon et du sein	17
Ifng$^{-/-}$	IFN-γ	↑ lymphomes (C57Bl6) ↑ adénocarcinomes pulmonaires (Balbc)	17
Pfp$^{-/-}$	Absence de perforine	↑ lymphomes B	2
Pfp$^{-/-}$ *Ifng*$^{-/-}$	IFN-γ et perforine	↑ lymphomes B	30
Trail$^{-/-}$	Absence de TRAIL	↑ lymphomes	5
Incidence de cancers spontanés chez des souris immunodéficientes et génétiquement prédisposées aux cancers			
Ifngr1$^{-/-}$ *Trp53*$^{-/-}$	Insensibilité à l'IFN-γ (Absence de p53)	Développement d'un spectre plus large de tumeurs que pour les souris *Trp53*$^{-/-}$	6
Stat1$^{-/-}$ *Trp53*$^{-/-}$	Insensibilité à l'IFN-α, IFN-β, IFN-γ (Absence de p53)	Développement d'un spectre plus large de tumeurs que pour les souris *Trp53*$^{-/-}$	6
Pfp$^{-/-}$ *Trp53*$^{+/-}$	Perforine (Hétérozygotie pour p53)	Développement de lymphomes à cellules B plus précocément que pour les souris *Trp53*$^{-/-}$	2
Trail$^{-/-}$ *Trp53*$^{+/-}$	TRAIL (Hétérozygotie pour p53)	Développement de lymphomes et de sarcomes plus précocément que pour les souris *Trp53*$^{+/-}$	5
Pfp$^{-/-}$ Her2/neu	Perforine (Fond génétique Her2/neu)	Développement d'adénocarcinomes mammaires plus précocément que pour les souris Her2/neu	31
Ja18$^{-/-}$ TRAMP	Absence de cellules NKT (Fond génétique TRAMP)	Développement de carcinomes de la prostate plus agressifs et plus précoces que pour les souris TRAMP	32
Klrk1$^{-/-}$ TRAMP	NKG2D (Fond génétique TRAMP)	Développement de carcinomes de la prostate plus importants et plus précoces que pour les souris TRAMP	33

Abréviations : ***cd***: cluster of differentiation; ***Ccl***: chemokine (C-C) ligand; **DMBA**: 7,12-di-methylbenz[a]-anthracene; **Her2/neu**: human epidermal growth factor receptor 2; ***Ifn***: interferon; ***Ifngr***: IFN-γ receptor ***Ja18***: Jα18 joining gene segment of TCR; ***Il***: interleukin; ***Klrk1***: killer cell lectin-like receptor subfamily K: member 1; **MCA**: methylcholanthrene; **MNU**: *N*-methyl-*N*-nitrosourea; **NK**: natural killer; **NK1.1**: NK cell–associated antigen 1.1; **NKG2D**: NK group 2: member D; **NKT**: natural killer T; ***Pfp***: perforine; **RAE**: retinoic acid early transcript; ***Rag***: recombination activating gene; **SCID**: severe combined immunodeficient; ***Stat1***: signal transducer and activation of transcription 1; ***Tcr***: T cell receptor; **TPA**: 12-*O*-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate; ***Trail***: TNF-related apoptosis-inducing ligand; **TRAMP**: transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate; ***Trp53***: transformation related protein 53; **UV**: ultraviolet.

Immunosurveillance antitumorale chez l'homme

Si l'utilisation de modèles murins déficients apporte des preuves convaincantes de l'implication des effecteurs cellulaires et moléculaires dans l'immunosurveillance antitumorale murine, la question de l'immunosurveillance antitumorale chez l'homme est beaucoup plus difficile à résoudre. Des preuves d'une surveillance des tumeurs par le système immunitaire ont tout de même été apportées par l'accumulation d'observations cliniques, biologiques et anatomopathologiques.

Observations cliniques

Très tôt, il a été observé que des situations cliniques associées à un déficit immunitaire présentaient un risque relatif de développement tumoral significativement plus élevé [34,35]. Les études épidémiologiques montrent en effet une augmentation de l'incidence de certains cancers chez les individus présentant un déficit immunitaire primitif (ataxie télangiectasie, syndrome de Wiskott Aldrich, trisomie 21) ou secondaire (syndrome de l'immunodéficience acquise, traitements immunosuppresseurs). Par exemple, le risque de développer un cancer après transplantation d'organe est deux à quatre fois plus important que dans la population générale [36] (**Tableau 2**).

Ces données épidémiologiques apportent des arguments solides en faveur d'une immunosurveillance, mais elles doivent cependant être nuancées. En effet, les tumeurs observées chez les patients immunodéprimés présentent pour la plupart une origine virale (virus d'Epstein-Barr, papillomavirus) ou bactérienne (*Helicobacter pylori*) reflétant donc la susceptibilité accrue de ces patients aux infections. De même, le fait que certains cancers non viro-induits soient augmentés après transplantation d'organe pourrait être lié à un effet cancérigène propre des traitements immunosuppresseurs, tels que la ciclosporine ou le tacrolimus. Enfin, le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) constitue un facteur de risque de cancer du poumon, indépendamment du tabagisme mais il est difficile de savoir si cette augmentation est le fait de l'immunodéficience ou du pouvoir oncogène du VIH [37,38].

D'autres situations d'immunodéficience sont également associées à une prédisposition pour le développement de cancers (**Tableau 2**), comme c'est le cas pour les patients porteurs d'un syndrome de Chediak-Higashi (caractérisé par un dysfonctionnement dans la cytotoxicité des NK) qui ont un risque de cancer 200 fois plus élevé que les sujets sains [39]. Certains polymorphismes des récepteurs NKG2D (*Natural killer group 2, member D*) ou KIR (*killer-cell immunoglobulin-like receptor*) – récepteurs activateurs ou inhibiteurs des NK – affectent la cytotoxicité des NK ; ces polymorphismes sont associés à un sur-risque de

développer des cancers [40,41]. Il en est de même pour certains polymorphismes inactivateurs de FasL, ou pour les patients porteurs de mutations du gène de la perforine [42,43].

Tableau 2 : Influence de déficits immunitaires sur l'incidence de cancers chez l'homme.

Individus	Caractéristiques immunitaires	Incidence de cancers	Réf.
Trisomie 21	Déficit fonctionnel des LT	↑ incidence leucémie aiguë myéloblastique (x20)	44
Syndrome de Wiskott-Aldrich	Déficit fonctionnel des LT et des LB	↑ incidence syndrome lymphoprolifératif secondaire à une infection par EBV	45
Ataxie télangiectasie	Déficit fonctionnel des LT	↑ incidence lymphomes, leucémies et maladies de Hodgkin	46
VIH	Déficit immunitaire lié à l'apoptose des LT CD4	↑ incidence de cancers viro-induits	47
		↑ incidence de cancers du poumon	37, 38
		Pas de risque accru de développer certains cancers non viro-induits et qui prédominent dans la population générale (ex : sein, prostate)	47
Transplantation	Immunodéficience secondaire liée à l'administration d'agents immunosuppresseurs	↑ incidence de cancers viro-induits	47
		↑ incidence de cancers non viro-induits	48
		↑ incidence des cancers de la peau (x200)	49
Mutation biallélique du gène de la perforine	Immunodéficience primaire (cellules NK et LT CD8+ peu fonctionnels)	↑ risque de développer des lymphomes non nécessairement viro-induits	50
Polymorphisme de NKG2D ou KIR	Faible activité cytotoxique des cellules NK	↑ risque de développer des cancers non viro-induits (poumons, intestins)	40, 51
Chediak-Higashi	Dysfonctionnement dans la cytotoxicité des NK	risque de cancer 200 fois plus élevé que les sujets sains	39

Antigènes associés aux tumeurs et réponse immunitaire

Le concept d'immunosurveillance antitumorale suppose que le système immunitaire est capable de distinguer les cellules tumorales, pourtant dérivées du « soi », des tissus normaux. Cette étape de reconnaissance des cellules tumorales est rendue possible par l'expression d'antigènes tumoraux. Les cellules tumorales se caractérisent en effet par une grande instabilité génétique à l'origine de nouvelles protéines ou de l'expression ectopique ou anormalement élevée de molécules qui les rendent différentes du « soi ».

Différentes approches reposant essentiellement sur la mise en évidence de réponses cytotoxiques ont permis d'identifier plusieurs dizaines d'antigènes associés aux tumeurs (TAA : *tumor-associated antigen*) chez l'homme [52]. Ils sont aujourd'hui classés en cinq grands groupes. Il s'agit des antigènes d'activation (ou antigènes de type cancer-testis : MAGE, NY-ESO-1, MUC1), des antigènes de différenciation (Melan-A/MART-1, tyrosinase, gp100, gp75, TRP-1, PAP, PSMA), des antigènes surexprimés (HER-2/neu, p53, ACE, télomérase), des antigènes codés par des gènes mutés (β-caténine, CDK4, caspase 8, α-actinine 4 et CDC27) et, enfin, de certains antigènes viraux (EBV, HBV, HCV et HPV).

La majorité des TAA identifiés à ce jour sont des antigènes tumoraux reconnus par des LT cytotoxiques. Des réponses à médiation humorale (mises en évidence par détection des anticorps dirigés contre les TAA) ont également été observées dans différents types de cancers (**Tableau 3**). Par exemple, des anticorps dirigés contre NY-ESO-1 sont présents dans 18,2% des cancers du poumon et 7,7% des cancers du sein, des proportions largement supérieures à celles trouvées chez des sujets sains (<1%). La fréquence d'anticorps contre ces antigènes chez les individus non atteints de cancers est très faible, sauf pour MUC1.

Tableau 3 : Diversité des cancers associés au développement de réponses humorales spécifiques contre certains antigènes tumoraux chez l'homme. Fréquence (%) de détection des anticorps dirigés contre des antigènes tumoraux chez les patients ou les sujets sains. D'après Reuschenbach et *al*., 2009 [53]. ND : non déterminé.

	p53	c-myc	NY-ESO-1	Her2/neu	MUC1	Cyclin B1	p62	Survivin
Sein	12,5	26,6	7,7	26,6	42,9	4,7	0,0	14,6
Foie	12,9	20,1	8,9	ND	ND	13,0	7,7	12,7
Poumon	9,1	12,4	18,2	23,5	34,6	34,8	19,3	20,4
Colon	7,7	11,7	0,0	ND	48,2	29,6	0,0	4,4
Sujets sains	2,0	1,0	0,6	2,0	23,3	1,4	0,7	0,7

L'observation de ces réponses cellulaires et humorales à l'encontre de certains antigènes tumoraux chez des patients atteints de cancers constitue un argument fort en faveur d'une immunosurveillance antitumorale.

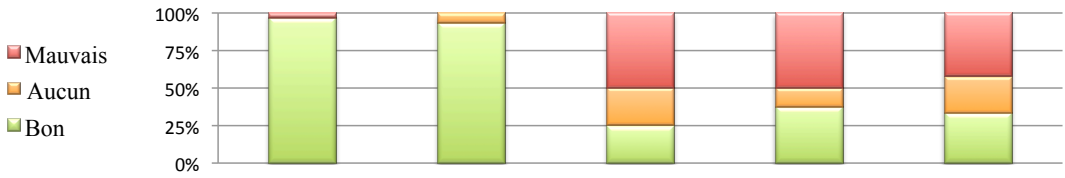
Infiltrat immunitaire des tumeurs et pronostic

Historiquement, la présence d'infiltrat leucocytaire dans des tumeurs solides humaines a été mise en évidence par Rudolph Virchow en 1863. Depuis, ces infiltrats immunitaires ont été observés dans le stroma tumoral de nombreux cancers et se caractérisent par une grande hétérogénéité quantitative, phénotypique et fonctionnelle en fonction du type de tumeurs mais également par une grande variabilité inter-individuelle.

Presque tous les types de cellules immunitaires ont été observés au niveau du stroma tumoral : macrophages, DC, mastocytes, LB, LT incluant les LT auxiliaires (Th1, Th2 ou Th17), les LT régulateurs (Treg) et les LT cytotoxiques. La corrélation entre la présence d'un infiltrat immunitaire et le pronostic clinique des tumeurs a été examinée dans de nombreux type de tumeurs. Une synthèse des résultats obtenus à partir de 124 publications étudiant l'infiltrat en LT est présentée **Tableau 4**.

Tableau 4 : Corrélation entre l'infiltrat immunitaire et le pronostic clinique. D'après Fridman et *al.* 2012 [54].

	$CD8^+CD45RO^+$	Th1	Th2	Th17	Treg
Mélanome	Bon				Aucun Mauvais
Cancer de la tête et du cou	Bon			Aucun	Bon
Cancer du sein	Bon	Bon Aucun	Bon Aucun		Aucun Mauvais
Cancer de la vessie	Bon				Bon
Cancer de l'ovaire	Bon	Bon	Mauvais	Bon	Bon Mauvais
Cancer de l'œsophage	Bon	Bon		Bon	
Cancer colorectal	Bon	Bon	Aucun	Mauvais	Bon Aucun
Carcinome rénal à cellules claires	Bon Mauvais	Bon			Mauvais
Adénocarcinome prostatique	Bon				
Carcinome pulmonaire	Bon Aucun	Bon		Mauvais	Mauvais
Cancer du pancréas	Bon		Mauvais		Mauvais
Cancer du col de l'utérus		Bon			
Cancer épidermoïde du canal anal					Aucun
Cancer du cerveau					Aucun
Carcinome hépatocellulaire	Bon Mauvais	Bon		Mauvais	Mauvais
Cancer de l'estomac		Bon	Mauvais	Bon	
Médulloblastome		Bon			
Carcinome à cellules de Merkel	Bon				
Carcinome urothélial	Bon				
Lymphome folliculaire et Lymphome de Hodgkin					Bon Mauvais Aucun
Nombre de publications	60	15	8	8	33



Pourcentage de publications corrélant l'infiltrat lymphocytaire à une amélioration de la réponse clinique (bon), à une diminution de la réponse clinique (mauvais) ou n'observant pas de corrélation (aucun) entre l'infiltrat en LT et la réponse clinique

D'une manière générale, la présence accrue de LT cytotoxiques ou de cellules Th1 a pu être reliée à un meilleur pronostic pour un nombre important de cancers. Cette corrélation positive entre la présence de ces lymphocytes infiltrant une tumeur et la survie des patients constitue une preuve convaincante de l'immunosurveillance antitumorale. Devant des résultats parfois contradictoires, il est par contre plus délicat de conclure concernant l'impact des cellules Th2, Th17 ou Treg sur le pronostic clinique.

Des cellules de l'immunité innée telles que les NK, ou les NKT sont également associées à une amélioration du pronostic dans différents types de tumeurs solides dont les tumeurs ovariennes [55] et coliques [56].

L'échappement des tumeurs au système immunitaire

L'ensemble de ces données expérimentales et cliniques valide donc le concept d'immunosurveillance antitumorale. L'action combinée de réponses immunitaires innées et adaptatives permet l'élimination des cellules tumorales, contribuant ainsi à la protection de l'organisme contre le développement des tumeurs. Pourtant, des cancers apparaissent même chez des patients immunocompétents. Il se produit donc au cours de l'évolution tumorale des changements permettant aux cellules tumorales d'échapper à leur élimination.

Ces changements portent à la fois sur des caractéristiques immunologiques de la tumeur et sur celles du système immunitaire. Les cellules transformées sont alors capables d'échapper à l'immunosurveillance soit par immunosélection, c'est-à-dire par la sélection de variants cellulaires tumoraux non immunogènes, soit par immunosubversion c'est-à-dire par des mécanismes actifs de suppression de la réponse immunitaire capables d'induire une tolérance du système immunitaire vis-à-vis de la tumeur [57].

Immunosélection

L'échappement tumoral à la réponse immune est le plus souvent associé à des anomalies de la présentation des antigènes par les molécules du CMH-I à la surface des cellules tumorales. L'absence partielle ou totale d'expression des molécules du CMH a en effet été documentée dans de nombreux types tumoraux humains, comme le mélanome, les carcinomes du côlon ou les cancers de la prostate [58,59]. Plusieurs mécanismes ont été impliqués comprenant la perte d'hétérozygotie des gènes codant pour le CMH-I, la perte d'expression (délétion ou mutation) du gène codant pour la β2-microglobuline [60,61] et la diminution d'expression des gènes impliqués dans la machinerie d'apprêtement et de présentation des antigènes : c'est le cas de TAP-1 (*transporter associated with antigen processing 1*), de LMP2 (*low molecular mass protein 2*), LMP7 et de la tapasine, dont

l'expression est progressivement perdue au cours par exemple de la cancérogénèse colique [62,63].

Les cellules tumorales sont également capables de développer des mécanismes d'échappement aux systèmes de lyse cellulaire produits par les LT cytotoxiques. Certaines tumeurs, en surexprimant l'inhibiteur de serine protéase PI9 bloquent la voie perforine-granzyme B, et ainsi échappent à la lyse cellulaire tumorale [64]. De même, les cellules tumorales sont capables d'échapper à la mort induite par les LT cytotoxiques par mutation ou diminution de l'expression des récepteurs de mort. Il a été également mis en évidence des mutations ou bien des phénomènes de méthylation de gènes impliqués dans l'apoptose des cellules cancéreuses comme le gène de la caspase 8, ou à l'inverse l'hyperexpression de FLIP (*FLICE-like inhibitory protein*, un inhibiteur de la caspase 8), ou encore l'expression de récepteur leurre pour TRAIL [65,66].

Immunosubversion

A coté de ces mécanismes d'immunosélection, les tumeurs et l'environnement tumoral sont capables également de développer des mécanismes actifs d'opposition à la réponse immunitaire antitumorale.

Par les cellules tumorales (*chemokine (C-C motif) ligand-5*)

Dans certains cas, les cellules tumorales peuvent directement induire l'apoptose des LT effecteurs. Plusieurs protéines exprimées par les cellules tumorales ont été impliquées, comme par exemple, B7-H1, FasL, EBAG9 (*estrogen receptor binding site associated, antigen, 9)*, TRAIL ou CD70 [65,67-69].

Les tumeurs peuvent également inhiber la phase effectrice des réponses antitumorales spécifiques. Par exemple, beaucoup de tumeurs humaines expriment la forme sous-glycosylée de la protéine MUC1, qui inhibe de manière réversible la prolifération des LT [70]. Certaines tumeurs (mais aussi des cellules de l'immunité présentes dans le microenvironnement tumoral) sont capables de sécréter de l'oxyde nitrique (NO), ou d'avoir une activité arginase 1 supraphysiologique, épuisant ainsi le milieu environnant en arginine, ces deux mécanismes pouvant se traduire par une inhibition des principales fonctions lymphocytaires T [71]. De façon parallèle, la dégradation du tryptophane par l'indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO), constitutivement exprimée par certaines cellules tumorales ou produite par certaines cellules du microenvironnement, favorise la résistance des cellules cancéreuses à la réponse immunitaire [72]. La carence en tryptophane bloque en effet la prolifération des LT $CD8^+$ [72] et l'accumulation consécutive de kynurénines favorise l'apoptose des LT $CD4^+$ [73].

Par les cellules immunosuppressives

Certains mécanismes d'immunosuppression peuvent également être liés à l'environnement tumoral et notamment à certaines cellules de l'immunité. La progression tumorale peut en effet s'accompagner de l'accumulation de cellules immunitaires telles que des macrophages, des cellules myéloïdes immatures ou des Treg.

Les macrophages sont très souvent les cellules immunitaires les plus fréquentes parmi l'infiltrat leucocytaire des tumeurs solides. Ils sont présents dans une grande diversité de cancers chez l'homme, dont les cancers du colon, les mélanomes, les cancers du rein, du poumon, de l'ovaire et du sein [74]. Les macrophages associés aux tumeurs (TAM: *tumor-associated macrophages*) ont plus volontiers un phénotype de type M2, c'est-à-dire produisant du TGF-β (*transforming growth factor-beta*), de l'IL-10, de la PGE2 (prostaglandine E2) et de l'arginase 1, du VEGF (*vascular endothelial growth factor*), et peu d'IL-12 ou d'IL-23. Ils favorisent donc ainsi plutôt une polarisation Th2 de la réponse immunitaire [75], l'angiogenèse tumorale [76], et sont globalement tolérogènes, donc défavorables au rejet de la tumeur. De même, les TAM favorisent la survie des cellules tumorales, leur prolifération et leur migration, notamment par la sécrétion de facteurs de croissance et de dégradation de la matrice extra-cellulaire [77].

Chez les souris porteuses de tumeurs, une population hétérogène de cellules myéloïdes immatures immunosupressives (MDSC : *myeloid-derived suppressor cell*) s'accumulant dans les organes lymphatiques [74]. Les MDSC inhibent l'activation des LT par des mécanismes impliquant le contact cellulaire direct ou la sécrétion de facteurs solubles tels que des espèces oxydantes toxiques (H_2O_2, NO). L'accumulation de cellules myéloïdes immatures s'observe également dans le sang des patients et est associée à la progression tumorale [78]. L'étude ultérieure de ces cellules myéloïdes a révélé qu'il s'agissait d'un mélange hétérogène de cellules hématopoïétiques plus ou moins différenciées. Une partie d'entre elles sont des macrophages et des DC immatures, d'autres sont des cellules à des stades plus précoces de la différenciation myéloïde. Ces cellules sont directement capables d'inhiber la stimulation antigénique de LT $CD8^+$ *in vitro* [79].

La progression tumorale peut également être associée à l'accumulation de Treg, phénotypiquement définis comme $CD3^+$, $CD4^+$ et $CD25^{high}$. Ces cellules régulent la tolérance périphérique par la production de cytokines immunosuppressives comme le TGB-β et l'IL-10 et inhibent ainsi la réponse T auxiliaire et T cytotoxique. Elles ont été mises en évidence dans le sang périphérique ou les infiltrats lymphocytaires de différents cancers. Il existe néanmoins un désaccord concernant leur impact sur le pronostic des cancers. En effet, leur présence a été

associée dans certains cas à une faible survie : cancer du sein [80,81], cancer de l'ovaire [82], cancer du poumon [83,84], carcinome hépato-cellulaire [85,86]. Dans d'autres études (portant parfois sur les mêmes pathologies), leur présence a été corrélée à une amélioration du pronostic : cancer de la tête et du cou [87,88], cancer de la vessie [89], cancer de l'ovaire [90]. Les raisons de ces observations contradictoires ne sont pas évidentes mais pourraient être en partie expliquées par un effet bénéfique des Treg lorsqu'ils diminuent l'inflammation chronique et au contraire un effet délétère lorsque leur présence s'oppose à l'action antitumorale des LT effecteurs [54].

D'autres cellules immunitaires du microenvironnement tumoral peuvent également être subverties par la tumeur, comme les NKT qui dans certains modèles sont capables d'induire la sécrétion de TGF-β par les MDSC et d'inhiber la cytotoxicité médiée par les LT [91].

La théorie de l'immunoediting

Ces dernières années, une théorie liant immunosurveillance et échappement tumoral a émergé : il s'agit du concept d'immunoediting [1]. Cette théorie définit les relations entre cellules transformées et système immunitaire selon trois phases : l'élimination, l'équilibre et l'échappement (**Figure 2**).

La phase d'élimination est la phase décrite par la théorie de l'immunosurveillance, au cours de laquelle les cellules en cours de transformation sont reconnues et détruites par le système immunitaire. La seconde phase est celle de l'équilibre où la croissance tumorale et la surveillance immunitaire sont en balance. Le système immunitaire exerce au cours de cette phase une pression sélective qui va permettre d'éliminer les cellules sensibles à son action ; cette phase se traduit par la sélection de cellules tumorales capables d'éviter ou de résister à la destruction par le système immunitaire, voire même d'induire une immunosuppression, et conduisant à la phase d'échappement. Le système immunitaire devient alors incapable de contrôler la croissance tumorale et des lésions néoplasiques détectables se développent.

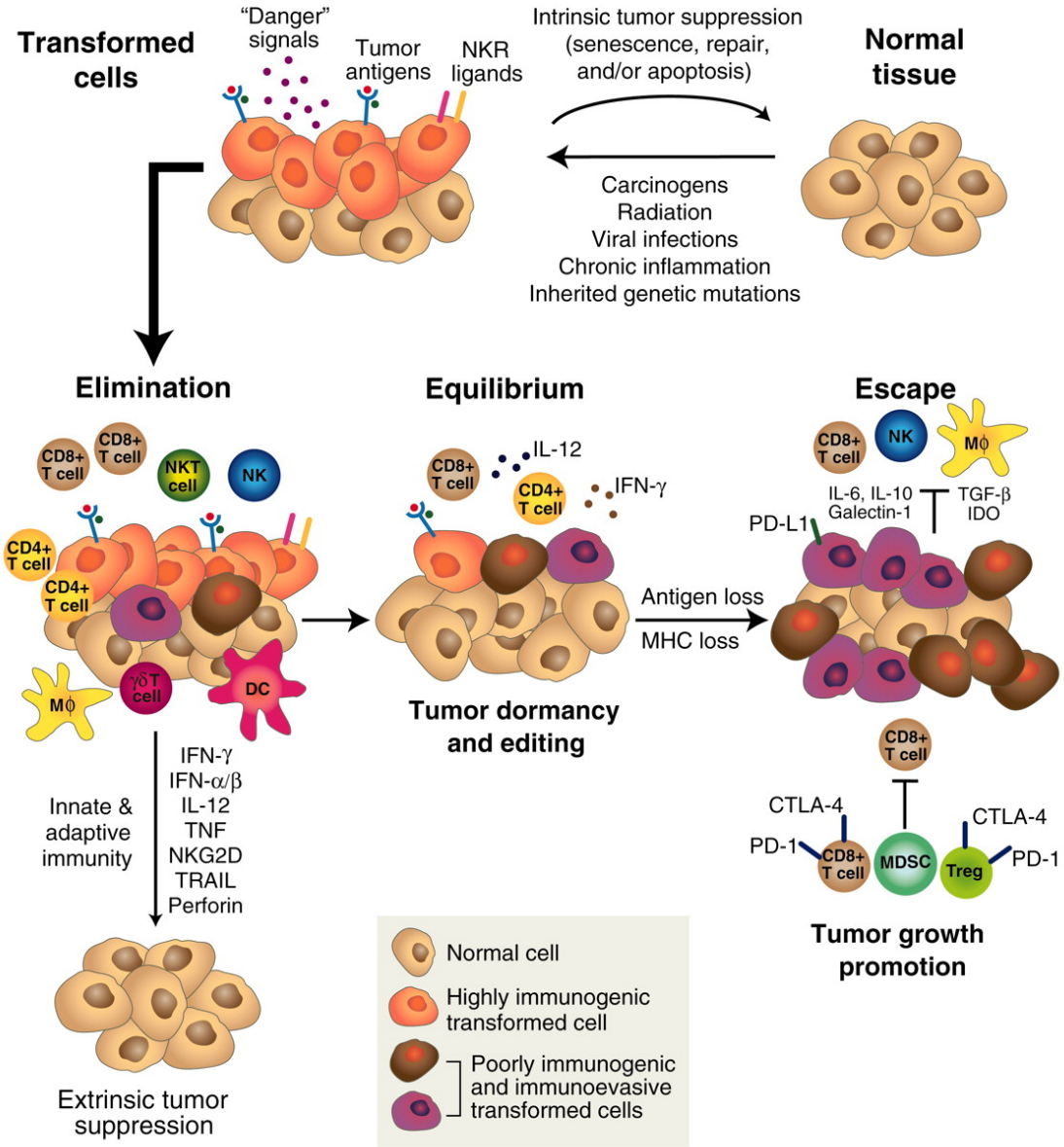


Figure 2 : Les 3 phases de l'immunoediting tumoral. L'étape préalable à l'immunoediting est la transformation des cellules normales en cellules tumorales via l'acquisition d'oncogènes et l'échappement aux mécanismes suppresseurs de tumeur intrinsèques à la cellule en cours de transformation cancéreuse. Dans la première phase de l'immunoediting, le système immunitaire joue le rôle d'un suppresseur de tumeur extrinsèque en éliminant les cellules tumorales, permettant un retour à l'état physiologique. Cependant, si le système immunitaire n'est pas suffisamment efficace, les cellules tumorales ayant échappé à la réponse immunitaire entrent dans une phase d'équilibre, phase au cours de laquelle les cellules de l'immunité limitent la croissance tumorale sans parvenir à éliminer complétement les cellules transformées. Enfin, ces cellules peuvent éventuellement acquérir d'autres mutations leur permettant d'échapper à la reconnaissance par le système immunitaire voire de contrôler ou d'éliminer les cellules immunitaires. Au cours de cette phase d'échappement, les tumeurs deviennent cliniquement détectables. D'après Schreiber *et al.* 2011 [1].

La théorie de la tolérance

La théorie de l'immunoediting ne fait pas l'unanimité. Des travaux récents menés sur un modèle murin de tumeurs sporadiques, modèle qui se veut plus proche des tumeurs humaines que ceux utilisant des carcinogènes, remettent en question l'existence d'une immunosurveillance antitumorale efficace. Les auteurs ont mis au point une construction génétique contenant un oncogène dormant (SV40) utilisé dans des souris transgéniques. L'oncogène dormant peut être activé suite à de rares événements stochastiques induisant l'apparition d'une tumeur exprimant un antigène tumoral connu. Chez ces souris, l'apparition d'une tumeur induit un phénomène de tolérance immune avec apparition d'une réponse lymphocytaire T non-fonctionnelle contre l'antigène tumoral présenté par les cellules cancéreuses [92]. G. Willimsky et T. Blankenstein concluent donc que les cellules tumorales échappent à la détection par le système immunitaire non pas par perte de leur immunogénicité mais grâce à l'induction d'une tolérance centrale ou périphérique [93].

L'influence du système immunitaire sur le développement tumoral est donc extrêmement complexe. Le système immunitaire a en effet un rôle paradoxal : il peut à la fois réduire la croissance tumorale en détruisant des cellules cancéreuses ou en bloquant leur expansion, mais il peut également favoriser la progression tumorale soit par sélection de cellules tumorales mieux adaptées à un processus de sélection darwinien, soit en créant des conditions qui favorisent l'expansion tumorale au sein du microenvironnement tumoral. Etudier l'interaction entre le système immunitaire et les cellules tumorales est d'autant plus difficile que les études sont réalisées à des stades déjà avancés du développement du cancer, lorsque la masse cancéreuse est déjà organisée et détectable. La compréhension de ces phénomènes laisse pourtant entrevoir de nouvelles perspectives thérapeutiques dont l'objectif serait la restauration ou l'induction de réponses immunitaires antitumorales efficaces ; l'immunothérapie antitumorale est désormais un domaine de recherche très prometteur.

Immunothérapie antitumorale

L'immunothérapie suscite l'espoir d'éradiquer les cellules tumorales sans affecter les cellules normales, et cela quelle que soit leur localisation, notamment au niveau métastatique. La stimulation du système immunitaire est une idée déjà ancienne car elle fut utilisée dès la fin du 19ème siècle. Dans les années, 1890, le chirurgien américain William B. Coley, considéré aujourd'hui comme le « père de l'immunothérapie du cancer », a décrit une rémission spontanée chez plusieurs patients atteints de sarcomes, après infection aigüe par des toxines bactériennes [94]. Depuis cette première immunisation non spécifique, les progrès accomplis dans le domaine de l'immunologie des cancers ont permis d'engendrer une diversité d'études précliniques mais également cliniques et donnent à l'immunothérapie une place croissante dans les thérapeutiques du cancer.

Plusieurs stratégies d'immunothérapie antitumorale ont été développées et débouchent sur des approches d'immunisation active ou passive, selon qu'il s'agit d'induire *in vivo* chez le malade la réponse immunitaire (vaccination) ou bien d'apporter au patient des effecteurs cytotoxiques de suppléance. Dans les deux cas, la stimulation d'une réponse immunitaire peut être dirigée contre un antigène tumoral (immunothérapie spécifique) ou indépendante de l'antigène (immunothérapie non spécifique).

Principales stratégies d'immunothérapie antitumorale

Immunothérapie non spécifique

Cette approche, fondée sur le principe d'une stimulation globale du système immunitaire, est la première à avoir été développée. Son intérêt réside dans la non-nécessité de connaître les antigènes spécifiques exprimés par la tumeur. Ainsi, l'instillation intra-vésicale du Bacille de Calmette-Guérin (IMMUCYST®) est préconisée dans le traitement des formes précoces et localisées des tumeurs de la vessie, afin d'induire une inflammation locale permettant, par la libération de cytokines et chimiokines, d'attirer les cellules de l'immunité [95]. Le traitement par cytokines est aussi approuvé dans plusieurs types de cancer, tels que l'adénocarcinome rénal métastatique, le mélanome, les lymphomes folliculaires, la leucémie myéloïde chronique (LMC) ou le myélome multiple. Ainsi, l'injection d'IL-2 et d'IFN-α dans l'adénocarcinome rénal a permis d'améliorer la survie des patients [96].

Immunothérapie par les anticorps monoclonaux

Depuis plusieurs années maintenant, la recherche se focalise sur les traitements ciblés et le développement d'anticorps monoclonaux dirigés contre les antigènes tumoraux a

constitué une avancée thérapeutique majeure dans l'immunothérapie des cancers chez l'homme. Ainsi, des anticorps contre Her2/neu (Trastuzumab : Herceptin®), CD20 (Rituximab : Mabthera®), le récepteur de l'EGF (Cétuximab : Erbitux®) ou le VEGF (Bévacizumab : Avastin®) ont démontré leur efficacité et sont prescrits dans un nombre croissant de tumeurs (cancers du sein, lymphomes, tumeurs du colon, cancers du rein, tumeurs ORL, cancers du poumon).

Ces anticorps agissent soit par action directe sur les cellules tumorales, soit *via* l'inhibition de molécules proangiogéniques. Initialement considérés comme des immunothérapies passives, il est aujourd'hui admis que leurs mécanismes d'action mettent également en jeu le recrutement d'effecteurs immunologiques. Une partie de leur action cytotoxique est en effet médiée par des macrophages ou cellules NK liant l'anticorps par son fragment Fc, ou via l'activation de la voie classique du complément [97,98]. Plus récemment, chez la souris, l'efficacité clinique de certains anticorps thérapeutiques a aussi été reliée à leur capacité à induire des LT antitumoraux en favorisant la présentation de l'antigène tumoral aux LT [99].

D'autres essais sont également en cours pour évaluer l'efficacité d'anticorps dont le mécanisme d'action vise, cette fois-ci explicitement, à stimuler le système immunitaire. Parmi les stratégies développées, le blocage spécifique du signal inhibiteur CTLA-4 (*Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4*) a montré des résultats porteurs d'espoir. En effet, CTLA-4 est une molécule de co-stimulation négative exprimée par les LT activés et qui après interaction avec ses ligands, délivre un signal inhibiteur de l'activation cellulaire. Le blocage spécifique de CTLA-4 empêche cet effet inhibiteur et stimule, de manière non spécifique, le système immunitaire. En 2011, un essai clinique a démontré que le blocage de CTLA-4 par l'Ipilimumab, un anticorps humanisé anti-CTLA-4 permettait d'améliorer la survie de patients atteints de mélanome métastatique [100]. Ces résultats ont permis l'autorisation de mise sur le marché de l'Ipilimumab (Yervoy®).

Une autre stratégie similaire au blocage de CTLA-4 consiste à inhiber spécifiquement la voie de costimulation négative PD-1/PDL-1 (*programmed cell death 1* / *programmed cell death 1 ligand 1*). L'interaction du ligand PDL-1 avec son récepteur PD-1 inhibe la prolifération des LT et affectent leur survie et leurs fonctions effectrices [101]. De plus, cette voie de signalisation compromet la mise en place d'une immunité antitumorale puisqu'elle induit l'apoptose des LT spécifiques d'antigènes tumoraux [67], favorisent la différentiation des LT $CD4^+$ en Treg [102] et permet aux cellules tumorales de résister à la lyse par les LT cytotoxiques [103,104]. Actuellement, plusieurs anticorps bloquant la voie PD-1/PDL-1 sont en

cours de développement clinique. Les premiers résultats cliniques obtenus avec un anticorps anti-PD-1 montrent un effet encourageant : les taux de réponse ont été de 28 % chez les patients atteints de mélanome (26/94 patients), de 27 % dans le cancer du rein (9/33 patients), et de 18 % pour les patients avec cancer du poumon (14/76 patients) [105,106]. A l'inverse, aucun effet n'a été constaté pour les 19 patients atteints de cancer colorectal et les 13 patients atteints de cancer de la prostate inclus dans cette étude. De manière intéressante, la présence de la protéines PD-L1 à la surface des cellules tumorales pourrait constituer un marqueur prédictif de réponse au traitement puisqu'un tiers des patients dont la tumeur exprime PD-L1 ont répondu au traitement alors que dans le groupe de patients dont les tumeurs n'expriment par ce ligand, aucun n'a répondu au traitement [105].

Immunothérapie adoptive

L'immunothérapie adoptive consiste à administrer aux patients des effecteurs autologues de l'immunité (LT, cellules NK, monocytes). Ces effecteurs de l'immunité, isolés à partir du sang ou de la tumeur, peuvent être stimulés *in vitro* de façon non spécifique, stimulés spécifiquement par des antigènes tumoraux ou modifiés génétiquement de manière à exprimer un TCR de forte affinité et spécifique d'un antigène tumoral.

Les expériences pionnières de thérapies cellulaires par transfert adoptif d'effecteurs cytotoxiques ont été réalisées dès 1984 par l'équipe de Rosenberg qui observe, après injections de lymphocytes activés, une réduction du nombre et de la taille des métastases dans plusieurs modèles de tumeurs murines [107,108]. Les souris guéries par ce traitement sont de plus immunisées contre une nouvelle greffe des cellules provenant de la tumeur d'origine, preuve d'une réponse spécifique antitumorale. Les résultats observés sur les tumeurs murines ayant été confirmés par plusieurs équipes, des essais cliniques ont été envisagés notamment dans le traitement du mélanome [109-112]. Dans l'une de ces études, les lymphocytes infiltrant les tumeurs sont prélevés à partir de mélanomes et mis en culture avec de fortes doses d'IL-2 de manière à lever l'état d'anergie induit par l'environnement tumoral. Avant réinjection, une déplétion lymphocytaire sévère est induite chez les patients par un protocole combinant la fludarabine et le cyclophosphamide. Rétrospectivement, ces différentes études réalisées indiquent que l'association des lymphocytes infiltrant la tumeur avec de l'IL-2 favoriserait les réponses cliniques et que l'immunodéplétion accroît la survie des patients et l'efficacité des lymphocytes injectés [111,113].

Malgré quelques résultats indiquant une meilleure survie des patients, le transfert adoptif reste expérimentalement lourd, et sa difficulté majeure reste de réussir à produire un

grand nombre de cellules T spécifiques d'un antigène déterminé, possédant des facultés fonctionnelles adéquates et des propriétés de survie appropriées.

Immunothérapie spécifique active

Avant l'identification des antigènes tumoraux, les approches vaccinales consistaient à immuniser les patients avec des cellules tumorales irradiées, des cellules tumorales génétiquement modifiées de manière à exprimer des molécules de costimulation ou à sécréter des cytokines, des fusions de cellules tumorales et de cellules présentatrices d'antigènes ou des extraits de cellules tumorales administrés en présence ou non d'adjuvants et de cytokines.

L'identification de différents antigènes tumoraux a rendu les stratégies d'immunisation active contre les tumeurs de plus en plus spécifiques. Différents types de vaccins ont été développés pour immuniser les patients, tels que des antigènes de tumeurs purifiés, des peptides synthétiques, de l'ADN nu, des virus recombinants ou, encore, des bactéries recombinantes et plusieurs de ces stratégies sont d'ores et déjà en cours d'évaluation dans des essais cliniques de phase 3. Dans le traitement des patients atteints de cancer de la prostate métastatique et résistant à la castration, un essai clinique de phase 2 a mis en évidence une prolongation potentielle de la médiane de survie globale des patients traités par le vaccin PROSTVAC-V/F par rapport au témoin placebo [114]. Ce vaccin associant deux vecteurs viraux issus de virus de la variole modifiés, exprimant l'antigène PSA (*prostate specific antigen*) humain et trois molécules de co-stimulation est à l'étude dans un essai d'efficacité de phase 3. Dans le traitement de patients atteints de cancer des poumons non à petites cellules, l'administration d'une protéine recombinante MAGE-A3 associée à un adjuvant a permis d'obtenir une réponse immunitaire cellulaire et diminue le risque de récidive [115]. De manière à confirmer ces résultats prometteurs, une étude de phase 3 randomisée est donc en cours et inclue des patients atteints de cancer des poumons non à petites cellules stades IB, II ou IIIA, MAGE-A3 positifs et en résection complète. Un autre type de vaccin commence également à faire ses preuves dans le traitement du cancer du rein. L'IMA901 est en effet un vaccin thérapeutique constitué de plusieurs peptides associés à la tumeur, qui administré en association avec le cyclophosphamide a montré une amélioration de la survie globale (23,5 mois contre 14,8 mois en médiane) [116]. Quelques soit l'approche vaccinale, ces différents essais cliques ont montré un excellent profil de tolérance et l'induction d'une réponse immune adaptative spécifique. De nouvelles recherches sont nécessaires afin d'améliorer les réponses cliniques observées.

Dans le but d'optimiser la réponse immune induite par la tumeur, plusieurs équipes cherchent à augmenter l'adressage des antigènes tumoraux aux DC. Pour ce faire, les DC sont manipulées *ex vivo* de manière à augmenter leur pouvoir immunogène avant de les injecter aux patients. Ainsi, les DC peuvent être respectivement chargées avec des peptides tumoraux, des extraits de cellules tumorales, des corps apoptotiques, des exosomes, ou encore être fusionnées avec des cellules tumorales. Dans toutes ces situations expérimentales, les DC possèdent la capacité d'activer *in vitro* des lymphocytes qui acquièrent des propriétés cytotoxiques.

En juin 2010, la FDA a approuvé la commercialisation du premier vaccin anticancéreux : le sipuleucel-T (Provenge®). Ce vaccin cellulaire – comprenant les cellules mononucléées autologues du patient sensibilisées *in vitro* avec une protéine de fusion associant l'antigène de prostate PAP (*phosphatase acid prostatique*) couplée au GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) – est indiqué dans le traitement des cancers de la prostate résistant à la castration. Après des essais de phase I et II concluants, deux essais de phases III ont en effet démontré une amélioration significative de la survie globale de 4,1 mois comparée au groupe placebo et ce, malgré une absence de bénéfice en terme de survie sans progression [117,118]. Le sipuleucel-T constitue donc le premier vaccin cellulaire mis sur le marché par une entreprise privée. Mais sa disponibilité semble compromise d'une part par la demande importante relative aux milliers de nouveaux cas de cancer de la prostate métastatiques diagnostiqués chaque année ; et d'autre part par le coût du traitement qui dépasse les 70 000€ pour 3 injections.

Vers une optimisation des protocoles d'immunothérapie antitumorale

Les nombreux essais cliniques d'immunothérapie ont mis en évidence des réponses immunologiques qui, malheureusement, ne s'accompagnaient pas nécessairement d'une réponse clinique. L'immunothérapie antitumorale a donc longtemps été considérée comme une approche thérapeutique séduisante mais peu efficace. Mais après les très nombreux échecs enregistrés au cours de ces dernières années, la mise sur le marché du sipuleucel-T et de l'Ipilimumab redonnent un dynamisme à cette voie thérapeutique. Pour améliorer les indications et l'efficacité de ces traitements, il est maintenant nécessaire de prendre en compte différents paramètres cliniques et biologiques.

Cancers à des stades précoces

L'une des explications aux nombreux échecs observés réside dans le fait que ces essais d'immunothérapie ont été menés sur des patients atteints d'un cancer avancé et ayant déjà subi

divers traitements. Il pourrait donc être judicieux que cette approche soit mise en œuvre plus tôt dans le processus d'évolution de la maladie et que des essais soient entrepris dans le but de prévenir ou traiter des récidives précoces de cancer. D'ailleurs, les résultats positifs de deux essais cliniques de vaccination antitumorale en situation adjuvante prouvent une meilleure efficacité des vaccins antitumoraux administrés à des stades précoces de la maladie. L'un de ces essais cliniques repose sur l'administration de la protéine Mage A3 mélangée à un adjuvant chez des patients atteints de cancer du poumon [119]. L'autre essai utilise un peptide dérivé d'Her2/neu comme immunogène pour vacciner des patientes atteintes de cancer du sein à haut risque de récidive [120].

Inhiber l'immunosuppression associée aux tumeurs

Une autre hypothèse pouvant expliquer la résistance des tumeurs à l'immunothérapie repose sur l'immunosuppression associée aux tumeurs. Les mécanismes responsables de l'immunosuppression sont nombreux mais de manière à améliorer l'efficacité des immunothérapies, il apparaît nécessaire de les identifier et surtout de développer des stratégies permettant de les contrecarrer.

Associer immunothérapie et approches antitumorales conventionnelles

Il fait peu de doute que l'immunothérapie n'est pas et ne sera pas capable d'éradiquer à elle seule une tumeur, en particulier à un stade avancé. Afin d'améliorer l'efficacité thérapeutique de l'immunothérapie, il semble donc judicieux de développer des stratégies thérapeutiques combinant des thérapies anticancéreuses cytotoxiques conventionnelles (chimiothérapie, radiothérapie) ou ciblées (inhibiteurs de tyrosine kinases ou anticorps monoclonaux) avec une immunothérapie. Plusieurs éléments laissent à penser que de telles associations pourraient synergiser. (i) Les traitements conventionnels, qu'il s'agisse de chimiothérapie, de radiothérapie ou de thérapie moléculaire ciblée entrainent une régression rapide de la tumeur, ce qui a pour effet de diminuer l'immunosuppression induite par les cellules tumorales et offre donc une fenêtre d'action favorable aux immunothérapies. (ii) Le relarguage de débris cellulaires résultant de la mort des cellules tumorales peut favoriser la présentation croisée d'antigènes tumoraux et par conséquent contribuer à l'induction d'une réponse immunitaire *in situ*. (iii) L'induction d'une réponse immunitaire antitumorale pourrait réduire les risques d'émergence de clones résistants aux traitements conventionnels. (iv) Certaines thérapies conventionnelles, en parallèle de leur effet directement cytotoxique sur les cellules tumorales, peuvent avoir des effets immunostimulants qui pourraient être améliorés

par une immunothérapie efficace. (v) Certains traitements peuvent également inhiber sélectivement les cellules immunosuppressives telles que les Treg ou les MDSC.

L'histoire des immunothérapies anticancéreuses est déjà longue, mais avec les succès cliniques et l'approbation réglementaire du vaccin sipuleucel-T dans le cancer de la prostate et de l'anticorps Ipilimumab dans le mélanome métastatique, ces dernières années constituent un tournant décisif dans le développement de l'immunothérapie antitumorale. Cette nouvelle approche visant à activer une réponse immunitaire doit maintenant s'intégrer dans la stratégie générale de prise en charge du cancer et notamment être associée aux traitements conventionnels regroupant les chimiothérapies, la radiothérapie et les thérapies moléculaires ciblées. De plus, il est maintenant bien établi que ces traitements conventionnels peuvent dans certains cas moduler les réponses immunitaires. Dans la perspective d'associer une immunothérapie à ces traitements, il apparaît donc nécessaire de décrypter leurs effets sur le système immunitaire. Dans la partie suivante, nous allons donc aborder les effets immunomodulateurs des traitements conventionnels, afin de guider leur combinaison rationnelle à des immunothérapies.

Relations entre système immunitaire et traitements antitumoraux

L'échappement tumoral à la réponse immunitaire, l'hématotoxicité induite par de nombreuses chimiothérapies, le développement de thérapies dites « ciblées » et l'utilisation concomitante de corticoïdes sont autant de facteurs qui jusqu'à présent ont conduit à négliger l'implication du système immunitaire dans les traitements anticancéreux – voire même ont amené à considérer chimiothérapie et immunothérapie comme incompatibles. D'ailleurs, les modèles utilisés pour le développement de nouveaux traitements passent par des techniques de xénogreffe de tumeurs humaines dans des souris immunodéficientes et négligent donc la capacité du système immunitaire à participer à la réponse antitumorale de ces nouveaux traitements [121].

Pourtant, de nombreux travaux ont permis de démontrer que la radiothérapie, certaines chimiothérapies ainsi que les thérapies moléculaires ciblées pouvaient générer ou favoriser l'induction d'une réponse immunitaire antitumorale qui participe à la réponse thérapeutique des traitements conventionnels.

Effets synergiques des chimiothérapies et du système immunitaire

Les premiers travaux suggérant qu'une partie de l'efficacité antitumorale des chimiothérapies pouvait être attribuée au système immunitaire ont été réalisé dès 1973. Dans ces expériences pionnières, Schwartz et *al.* montrent en effet que les anthracyclines induisent des réponses antitumorales plus intenses chez les souris immunocompétentes que chez les souris immunodéprimées [122]. Depuis, de nombreux travaux sont venus confirmer l'existence d'une contribution du système immunitaire à l'efficacité des traitements anticancéreux et certains mécanismes – pouvant être communs à plusieurs molécules – ont pu être élucidés (**Figure 3**). Les chimiothérapies peuvent induire une immunité antitumorale en agissant directement sur les cellules tumorales, ou directement sur les cellules immunitaires en stimulant les propriétés des cellules effectrices ou au contraire en inhibant ou en éliminant les cellules immunosuppressives. Ces nombreux mécanismes sont abordés dans une revue de littérature récente [123] et ceux faisant l'objet de recherche au sein de notre unité seront développés dans la partie suivante.

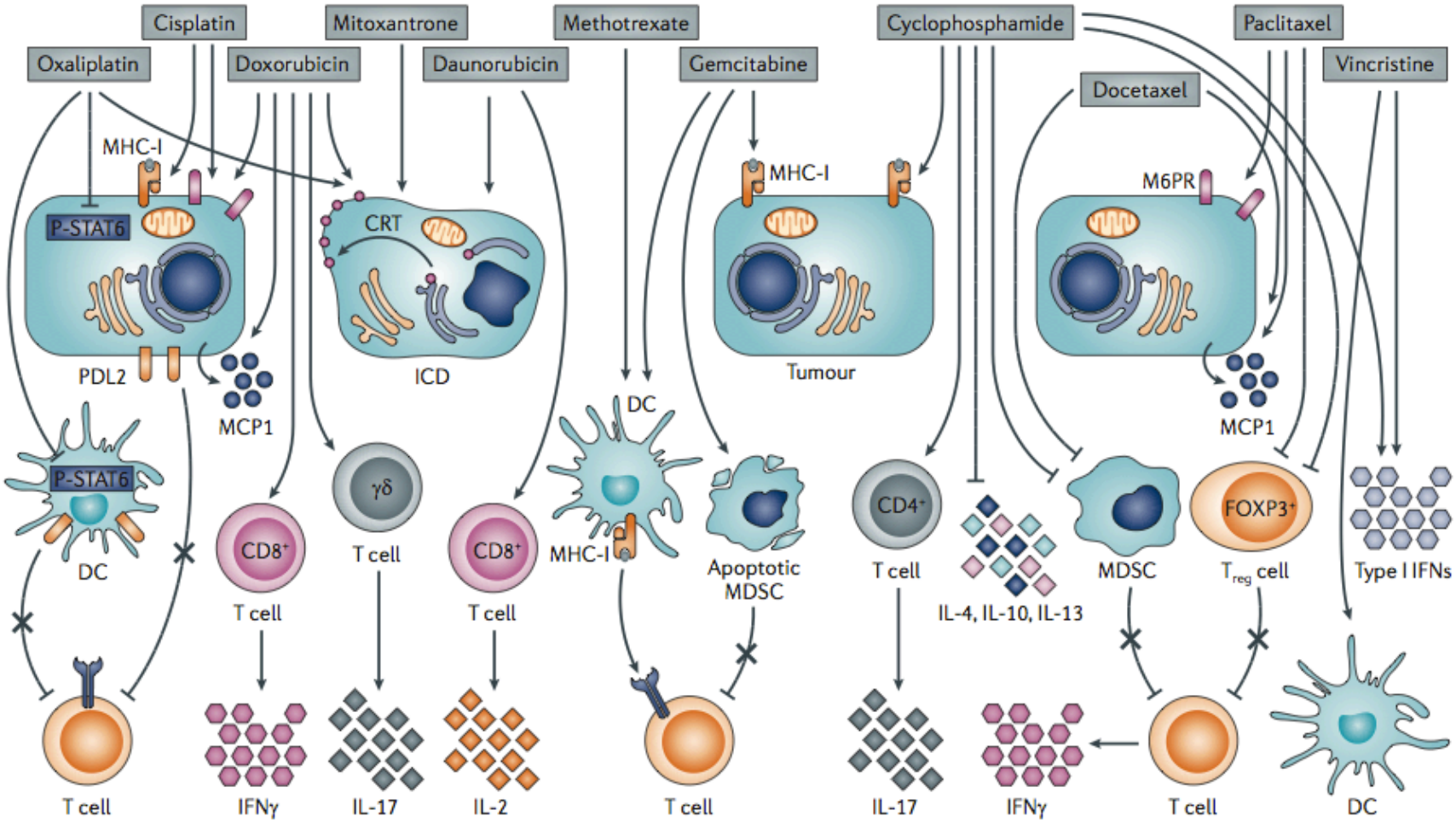


Figure 3 : Mécanismes par lesquels les chimiothérapies affectent le système immunitaire. Les chimiothérapies peuvent induire une immunité antitumorale en activant directement les LT $CD4^+$, $CD8^+$ ou γδ, en augmentant la production d'INFγ, IL-17, ou d'IL-2, en favorisant la maturation ou l'activation des DC, en inhibant ou en éliminant les cellules immunosuppressives tels que les MDSC ou les Treg, en induisant une mort cellulaire immunogène, en augmentant l'expression des molécules du CMH-I à la surface des cellules tumorales, en augmentant la perméabilité des cellules tumorales au granzyme B. D'après Galluzzi *et al.* 2012 [123].

Immunogénicité de la mort cellulaire

Contre toute attente, certains signaux émis par les cellules apoptotiques peuvent être à l'origine d'une réponse immunitaire [124]. Ce sont notamment les signaux permettant l'attraction des phagocytes (« *find me* » signal) ainsi que ceux initiant la phagocytose (« *eat me* » signal) [125]. En régulant la phagocytose, l'apprêtement et la présentation des antigènes tumoraux ainsi que la maturation des DC, les mécanismes de co-stimulation, et la polarisation de la réponse lymphocytaire, ces signaux de danger sont capables d'induire une réponse immunitaire spécifique efficace. L'efficacité de cette réponse immunitaire est fonction du type cellulaire, du contexte tissulaire mais également des composés cytotoxiques utilisés [126].

Parmi les molécules utilisées en oncologie, plusieurs ont montré une capacité à provoquer une mort cellulaire immunogène, c'est-à-dire capable d'induire une réponse immunitaire spécifique efficace [127]. C'est le cas notamment des anthracyclines et de l'oxaliplatine dont l'efficacité est étroitement corrélée à l'intégrité du système immunitaire. La réponse immunitaire induite par les anthracyclines et l'oxaliplatine est également diminuée en présence d'inhibiteurs de caspases, soulignant le rôle majeur de la mort cellulaire – et plus précisément de l'apoptose – dans ce mécanisme.

Des travaux successifs réalisés par notre équipe de recherche ont permis d'élucider certains des paramètres moléculaires déterminant l'immunogénicité de la mort cellulaire induite par les anthracyclines et l'oxaliplatine [128] (**Annexe 1**). Trois points-clés essentiels à l'induction d'une mort immunogène ont été mis en évidence : la translocation du complexe CRT/ERp57 (*calreticulin / endoplasmic reticulum resident protein 57*), la sécrétion par les cellules tumorales de la protéine nucléaire HMGB1 (*high mobility group box 1*) et de la sécrétion toujours par les cellules tumorales de l'ATP (*adenosine triphosphate*). Ces différents signaux – CRT/ERp57, HMGB1 et ATP – favorisent la mise en place d'un dialogue entre cellules tumorales mourantes et système immunitaire, nécessaire à l'induction d'une immunité antitumorale.

L'exposition du complexe CRT/ERP57 favorise la reconnaissance et la phagocytose des cellules tumorales mourantes par les DC [129]. Le récepteur impliqué dans ce mécanisme n'a pas pour l'instant pu être identifié avec certitude. HMGB1 est quant à lui sécrété par les corps apoptotiques dans l'espace intercellulaire où il est reconnu par TLR4 (*Toll Like Receptor-4*) exprimé à la surface des DC [130]. L'activation de la voie TLR4/Myd88 induite par la liaison de l'HMGB1 régule l'apprêtement et la présentation des antigènes tumoraux par les DC et est donc indispensable à l'établissement d'une réponse immunitaire antitumorale.

Enfin, l'ATP secrétée par les cellules tumorales mourantes stimule le récepteur purinergique P2RX7 (*purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel*) exprimé à la surface des DC [131]. Cette interaction induit alors la production de cytokines essentielles à l'induction de réponses immunitaires spécifiques, tel que l'IL-1β.

Ces résultats obtenus à partir de modèles murins sont fortement renforcés en clinique par la mise en évidence de deux polymorphismes des gènes TLR4 et P2RX7. En effet, il existe chez l'homme un polymorphisme du gène *TLR4*, associé à une diminution d'affinité de ce récepteur pour son ligand HMGB1. La présence de ce polymorphisme a été corrélée à une progression métastatique plus rapide chez des patientes atteintes de cancer du sein non métastatique avec envahissement ganglionnaire et recevant des anthracyclines et de l'irradiation locale en traitement adjuvant [130]. De même, la présence de ce même polymorphisme a été corrélée à une plus faible survie chez des patients atteints de cancer colorectal avancé recevant de l'oxaliplatine [132]. Il existe également chez l'homme, un polymorphisme dans le gène P2RX7 (Glu496Ala) qui diminue la capacité de ce récepteur à se lier à l'ATP. Les monocytes présentant ce polymorphisme produisent moins d'IL-1β en réponse à une stimulation par l'ATP. Dans une cohorte de patientes atteintes de cancer du sein et traitées par des anthracyclines, la présence de ce polymorphisme est associée à une plus faible survie [131].

Recrutements de lymphocytes T γδ

Dans un modèle murin, nous avons mis en évidence le rôle des LTγδ producteurs d'IL-17 dans l'efficacité thérapeutique de la doxorubicine [133,134] (**Annexe 2**). Les souris déficientes pour les LTγδ, ou ayant reçu un anticorps neutralisant l'IL-17A ou incapables de répondre à cette cytokine (IL-17ra$^{-/-}$) ne développent pas de réponses IFN-γ spécifiques contre des cellules tumorales exposées à des chimiothérapies immunogènes. L'efficacité des anthracyclines est par conséquent compromise dans ces différents modèles.

Elimination sélective de populations immunosuppressives

Si les fortes doses de cyclophosphamide (CTX) sont associées à un effet antitumoral cytotoxique direct et à une lymphoablation, de faibles doses de CTX, en administration répétée ou continue, sont associées à une stimulation de la réponse immunitaire antitumorale, essentiellement par réduction du nombre de Treg et de MDSC [135]. Les faibles doses de CTX permettent également d'inhiber les fonctions immunosuppressives des Treg en agissant sur différents marqueurs clés, dont FOXP3 (*forkhead box P3*), et GITR (*glucocorticoid induced TNF receptor related protein*). Enfin, de faibles doses de CTX favorisent la différenciation

des LT naïfs en lymphocytes Th17 [136], restaurent les fonctions effectrices des LT et des NK de patients avec cancer avancé [137], stimulent l'expression d'IFN type I et inhibent l'expression de cytokines immunosuppressives (notamment IL-4, IL-10 et IL-13) [138].

Immunomodulation par les thérapies ciblées

A la différence de la chimiothérapie, le concept des thérapies ciblées repose sur une connaissance approfondie des mécanismes moléculaires impliqués dans la cancérogenèse. Le développement de cette classe de produits a été rendu possible par les progrès réalisés dans la compréhension de la machinerie protéique de la cellule. Ainsi, le développement des thérapies ciblées est guidé par des principes rationnels, permettant de bloquer le fonctionnement d'une protéine bien définie.

La spécificité est pourtant loin d'être totale. Par exemple, l'Imatinib mésylate (IM) a été développé afin d'inhiber sélectivement l'activité tyrosine kinase d'une protéine oncogénique n'existant que dans une seule maladie, en l'occurrence la LMC. Mais, même dans ce cas présent, la spécificité n'est pas totale puisque des récepteurs à activité tyrosine kinase (dont c-kit et PDGFR (*platelet derived growth factor receptor*)), exprimés par de nombreuses autres cellules normales, sont aussi inhibés par l'IM. Fort heureusement, cette situation présente des avantages et confère à ce médicament une efficacité très intéressante sur les tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST : *gastrointestinal stromal tumors*) [139]. Dans d'autres situation, cette interaction non spécifique peut être responsable d'effets indésirables comme c'est le cas pour certains anticorps monoclonaux ou inhibiteurs de tyrosine kinase à l'origine de toxicité cardiaque.

De façon intéressante, les effets « *off-target* » de certaines thérapies ciblées semblent capables d'agir sur le système immunitaire. En effet, l'efficacité thérapeutique de plusieurs thérapies ciblées repose – au moins en partie – sur des mécanismes impliquant le système immunitaire (**Figure 4**). Comme pour les chimiothérapies, ces mécanismes sont multiples, complexes

Les anticorps thérapeutiques présentent des modes d'action très variés et souvent multiples. Le mode d'action le plus commun correspond à la fixation de l'anticorps sur sa cible pour bloquer son activité biologique et l'interaction avec d'autres partenaires. Ils peuvent aussi empêcher les processus d'homo- ou d'hétéro-dimérisation de récepteurs, ou même induire des voies de signalisation provoquant l'internalisation des récepteurs ou bien l'apoptose des cellules cibles. Cependant, les anticorps monoclonaux n'ont pas nécessairement besoin de posséder une activité pharmacologique sur leur cible pour être de

puissants agents thérapeutiques. En effet, grâce à leur fragment Fc, les anticorps peuvent interagir avec le système immunitaire de l'hôte et déclencher l'élimination de l'antigène ciblé par différents mécanismes cytotoxiques : ADCC (*antibody dependent cell-mediated cytotoxicity*), ADCP (*antibody dependent cell-mediated phagocytosis*) et CDC (*complement dependent cytotoxicity*). Ces trois modes d'action entraînent la destruction de l'antigène ou de la cellule cible et participent à l'efficacité clinique des anticorps anti-tumoraux. D'autres processus permettant aux anticorps monoclonaux de synergiser avec le système immunitaire ont également été mis en évidence. Le trastuzumab, par exemple, est un anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain (HER2 : *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*). En plus de bloquer la transduction du signal HER2, le trastuzumab favorise la production de LT $CD8^+$ spécifique de HER2 [140] et améliore l'infiltration des tumeurs par les cellules NK [141].

Parfois une même molécule peut avoir des effets en faveur d'une activation du système immunitaire et au contraire des effets inhibant le système immunitaire. L'erlotinib par exemple, est associé à une augmentation de l'expression des molécules CMH de classe I et II [142], facilitant ainsi la reconnaissance des cellules tumorales par les effecteurs immunitaires. Pourtant, en inhibant les voies de signalisation c-Raf/Erk et Akt, l'erlotinib semble également capable de compromettre la réponse immunitaire notamment en inhibant l'activation et la prolifération des LT.

Le sunitinib et le sorafénib sont deux inhibiteurs de tyrosine kinase utilisés dans le cancer du rein et dans le carcinome hépatocellulaire. Dans les cancers du rein, ces deux molécules ont été associées à une diminution de l'infiltrat Treg et MDSC [143-147], facilitant ainsi le développement de réponse antitumorale Th1 [145]. D'un autre côté, le sorafénib – mais pas le sunitinib – inhibe *in vitro* les fonctions et la maturation des DC [148]. En effet, l'activation des DC par les ligands TLR est diminuée en présence de sorafénib. On observe notamment une diminution de sécrétion des cytokines, une diminution de l'expression des molécules de co-stimulation, d'adhésion et des CMH ainsi qu'une diminution de l'activation des LT.

Enfin, un grand nombre d'études met en évidence les effets immunomodulateurs de l'IM. Le rôle immunomodulateur de l'IM sera donc abordé en détail dans la partie suivante.

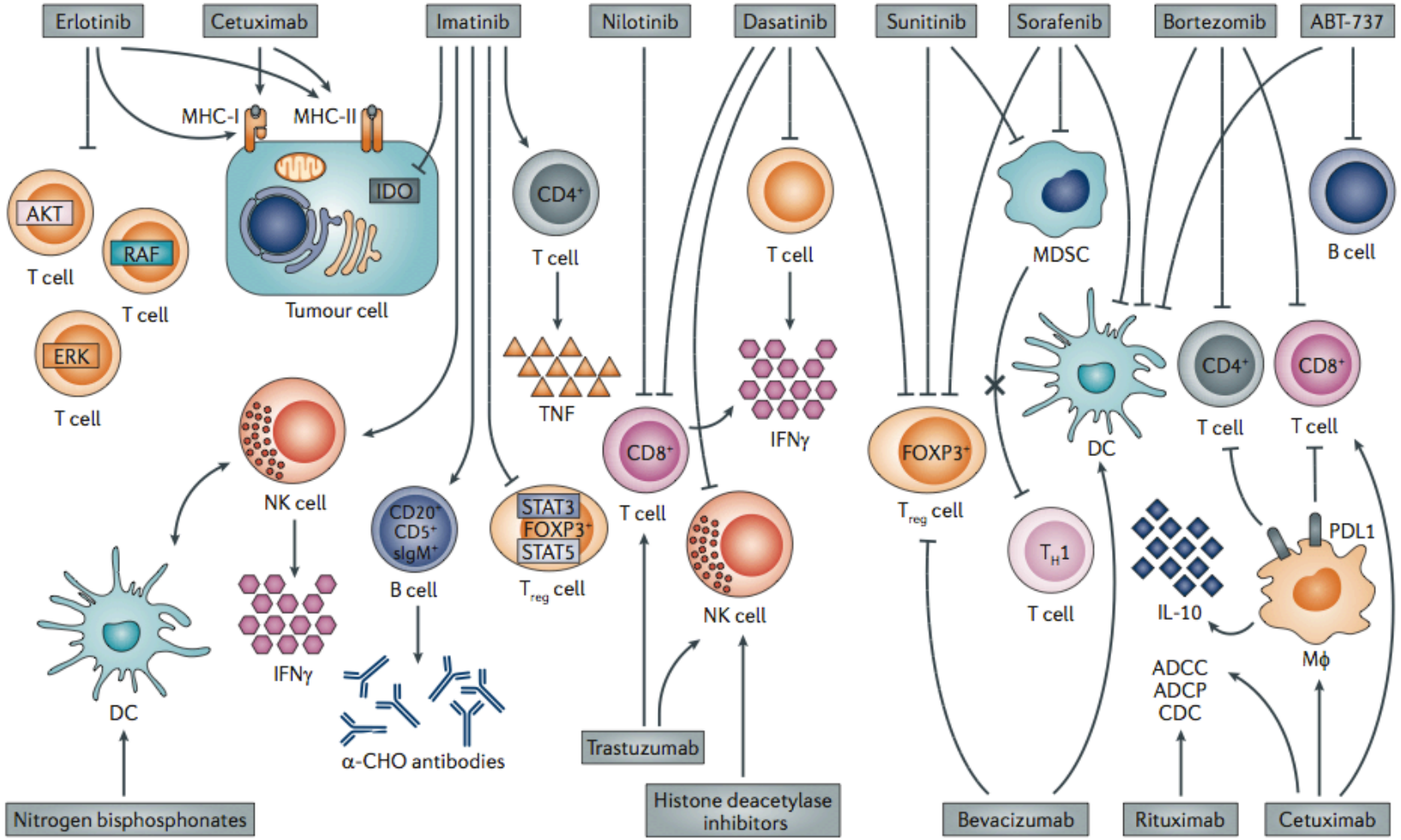


Figure 4 : Mécanismes par lesquels les thérapies ciblées affectent le système immunitaire. D'après Galluzzi *et al.* 2012 [123]. Les thérapies moléculaires ciblées peuvent déclencher une réponse immunitaire en activant directement les LT, NK ou DC et/ou en inhiber les MDSC ou les Treg. Les anticorps monoclonaux peuvent aussi favoriser l'ADCC (*antibody dependent cell-mediated cytotoxicity*), l'ADCP (*antibody dependent cell-mediated phagocytosis*) ou la CDC (*complement dependent cytotoxicity*). Au contraire, les thérapies moléculaires ciblées peuvent inhiber une réponse immunitaire en déplétant les LB, LT, NK ou DC, ou en favorisant le recrutement de macrophages.

Effets immunomodulateurs de l'Imatinib

Développement de l'Imatinib

Chef de file des inhibiteurs de tyrosine kinase, l'IM constitue la première preuve de validité du concept de thérapie ciblée. L'histoire de son développement a commencé avec la découverte de la première anomalie génétique associée à la LMC : le chromosome Philadelphie.

Le chromosome Philadelphie est le résultat de la translocation réciproque et équilibrée entre les bras longs des chromosomes 9 et 22 : t(9;22)(q34;q11) [149,150]. Sur le bras long du chromosome 9 la région abl (Abelson) se coupe et sa partie télomérique vient se localiser à la place de la partie télomérique du bras long du chromosome 22 dans une région appelée bcr (*Breakpoint Cluster Region*) [151,152]. Cette translocation aboutit à un chromosome 22 très court sur lequel se trouve le gène chimérique *BCR-ABL*, formé du début de *BCR* et de la fin d'*ABL* [153]. La conservation du cadre de lecture permet la synthèse d'ARN messagers hybrides dits chimériques comportant des séquences BCR en 5' et ABL en 3'. L'ARN chimérique est traduit en une protéine de fusion BCR-ABL ayant une activité tyrosine kinase constitutive.

La protéine BCR-ABL perturbe de nombreuses fonctions cellulaires : l'hyperactivité tyrosine-kinase dérègle les voies Ras, STAT-3 (STAT : *signal transducer and activator of transcription*), STAT-5 et PI-3 kinase (**Figure 5**). Les effets qui en découlent sont une inhibition de l'apoptose, l'activation de la multiplication cellulaire et l'atténuation de l'adhérence des cellules leucémiques au stroma médullaire. En 1990, Lugo *et al.* mettent en évidence le rôle essentiel de l'activité tyrosine kinase dans le pouvoir transformant de la protéine BCR-ABL [154]. Les souris dont les moelles osseuses sont greffées avec des cellules infectées par un rétrovirus contenant le gène *BCR-ABL* développent en quelques semaines une maladie très similaire à la LMC humaine [155]. Ces différentes propriétés ont fait de la protéine BCR-ABL une cible séduisante.

Dans les années 1990, un programme portant sur le développement d'inhibiteurs de tyrosine kinase s'est plus particulièrement intéressé à la structure d'une molécule capable d'inhiber sélectivement la poche ATP de la protéine BCR-ABL et ceci, sans altérer le fonctionnement d'autres kinases physiologiquement nécessaires à la bonne marche des cellules normales. Ce programme a permis la mise au point d'une molécule de bonne efficacité biochimique et semblant non toxique : le STI571. Rapidement, cette molécule – dénommée Imatinib par la suite – s'est montrée exceptionnellement active sur les cellules leucémiques tout en préservant les cellules saines [156]. Le STI571 agit par inhibition

compétitive de l'ATP au niveau du site catalytique de la protéine kinase. Cette interaction inhibe l'autophosphorylation de l'enzyme, qui interfère avec son activation et bloque le signal de transduction [157,158]. Cela a pour conséquences d'inhiber sélectivement la prolifération des cellules BCR-ABL positives et d'induire leur apoptose.

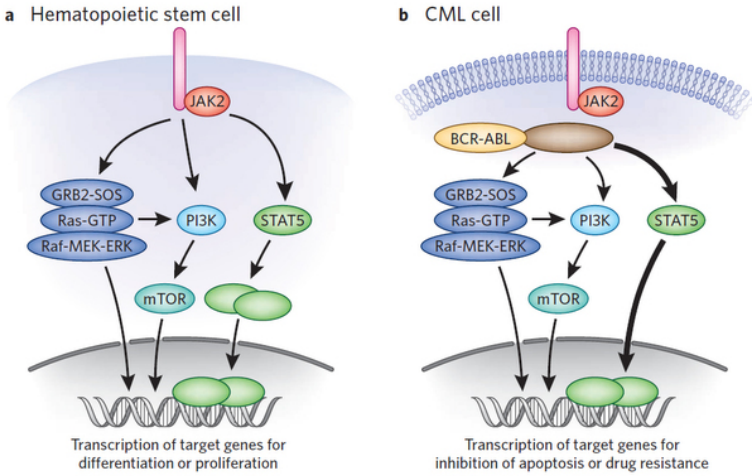


Figure 5 : Voies de signalisation perturbées par la protéine BCR-ABL. La production de la protéine BCR-ABL est un événement cellulaire majeur qui perturbe de nombreuses fonctions cellulaires dont l'apoptose, la multiplication cellulaire et l'atténuation de l'adhérence des cellules leucémiques au stroma médullaire. D'après Fabbro *et al.* 2012 [159].

Autres cibles moléculaires de l'Imatinib

Une fois synthétisé, l'IM a été testé non seulement sur la cible pour laquelle il avait été conçu mais aussi sur d'autres cibles moléculaires. Ainsi deux autres tyrosine kinases se sont avérées inhibées par l'IM : c-kit et PDGFR.

c-kit est un récepteur à activité tyrosine kinase de 145 kDa, dont le ligand est un facteur de croissance des cellules souches, le SCF (*stem cell factor*). Il est normalement exprimé par les mastocytes, les cellules souches hématopoïétiques, les cellules germinales, les mélanocytes et les cellules interstitielles de Cajal. Il joue un rôle important dans la différenciation et la croissance de ces cellules. Différents types d'anomalie moléculaire (délétions, mutations ponctuelles, insertions) peuvent être responsables d'une activation constitutive de c-kit. L'activation permanente de la tyrosine kinase de c-kit entraîne une stimulation mitogénique en l'absence de ligand [160]. En dépit de son expression dans plusieurs types tumoraux − GIST (95%), carcinome thymique (86%), séminomes (84%), oncocytome (80%), carcinome chromophobe (45%), carcinome adénoïde kystique salivaire (77%), mélanomes (36%), carcinomes folliculaires de la thyroïde (23%) [161] − la contribution de c-kit dans la transformation maligne n'est établie que pour les GIST.

Le PDGFR, troisième cible de l'IM, est un récepteur à activité tyrosine kinase dont le ligand est un facteur de croissance plaquettaire, le PDGF (*platelet derived growth factor*). Ce récepteur existe sous deux formes de forte homologie de structure : PDGFRα et PDGFRβ. Il est normalement exprimé par les cellules du tissu de soutien ; il joue un rôle dans le développement embryonnaire et la cicatrisation tissulaire [162]. Son rôle dans la tumorogenèse de certains cancers est actuellement bien documenté. Dans la *dermatofibrosarcoma protuberans* (DFSP), PDGFR est activé de manière constitutive, induisant des signaux intracellulaires oncogéniques [163]. De même, les glioblastomes sont caractérisés par une activation autocrine du PDGFR [164].

Indications thérapeutiques de l'Imatinib

Leucémie myéloïde chronique

Le traitement de la LMC a été radicalement modifié depuis l'introduction de l'IM dans l'arsenal thérapeutique de cette maladie. Dès les premiers résultats de l'essai prospectif IRIS (*International randomized study of interferon versus STI571),* qui a randomisé l'IM contre l'association INF-α + aracytine, l'IM à la dose de 400 mg par jour s'est imposé comme le traitement de première intention dans la LMC en phase chronique [165,166]. En effet, par sa facilité d'administration et surtout du fait de sa remarquable efficacité, l'IM a supplanté toutes les thérapeutiques antérieures (**Figure 6**). La FDA (*Food and Drug Administration*) a donc approuvé la mise sur le marché américain de l'IM pour traiter la LMC en 2001, soit moins de trois ans après le début de la première étude clinique.

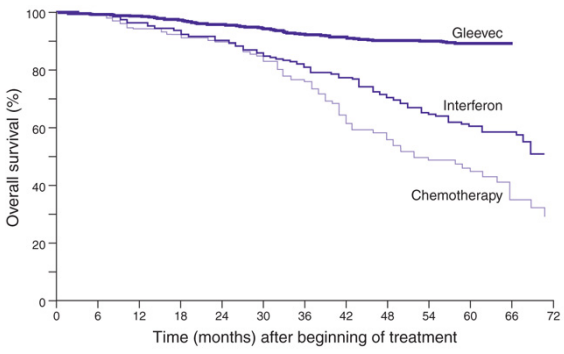


Figure 6 : Courbe de survie globale des patients traités par INF-α, aracytine ou par IM. Après un suivi médian de 60 mois, la survie globale est de 89% dans le bras IM, alors qu'elle est de moins de 50% avec les thérapies antérieures. D'après Druker *et al.* 2009 [167].

Tumeurs stromales gastro-intestinales

Les GIST sont des tumeurs mésenchymateuses du tube digestif. Elles trouveraient leur origine dans les cellules interstitielles de Cajal qui jouent un rôle clé dans la motricité automatique du tube digestif. Leur fréquence est estimée à environ 12 cas pour 10^6 habitants [168,169].

Sur le plan anatomopathologique, ces tumeurs se présentent sous la forme d'une prolifération de cellules fusiformes et/ou épithélioïdes qui, dans plus de 95 % des cas, expriment c-kit. La positivité de c-kit est d'ailleurs considérée comme pathognomonique mais manque malgré tout de spécificité.

L'expression de c-kit à la surface de la quasi-totalité des GIST a attiré – notamment du fait qu'il s'agit d'un potentiel oncogène [169,170] – l'attention scientifique sur le rôle exact de cette protéine dans la physiopathologie de ces tumeurs. Ainsi, en 1998, ont été identifiées des mutations activatrices de c-kit, donnant à la protéine une conformation constitutionnellement activée, indépendante de son ligand [171]. Ces mutations, identifiées dans 5 GIST, concernaient toutes l'exon 11, codant pour la portion juxtamembranaire intracellulaire du récepteur. D'autres études ont montré que les mutations activatrices de c-kit étaient une caractéristique ubiquitaire des GIST, puisqu'elles étaient retrouvées dans près de 90 % des cas et qu'elles pouvaient intéresser d'autres portions de la protéine, notamment l'exon 9 [172] et beaucoup plus rarement les exons 13 et 17 [160].

Concernant les GIST c-kit négatives, une forte surexpression de PDGFRα a été observée [173]. Tout comme c-kit, des mutations de PDGFRα ont été mises en évidence [174]. Elles concernent 35 à 67 % des GIST c-kit WT, soit 5 à 7 % de toutes les GIST. Elles siègent essentiellement au niveau des exons 18, 12 et 14, et sont responsables d'une activation constitutionnelle du récepteur. Les GIST dits de type sauvage, c'est-à-dire ne présentant de mutation ni pour c-kit, ni pour PDGFR, représentent seulement 5 à 10% des GIST.

L'IM a été proposé la première fois à une patiente finlandaise présentant une tumeur stromale c-kit$^+$ en mars 2000 sur une idée basée conjointement sur la découverte de la protéine c-kit à la surface des GIST et l'efficacité de l'IM à inhiber l'activité tyrosine-kinase c-kit [175]. Pour cette patiente, l'efficacité clinique de l'IM s'est avérée spectaculaire [139]. Cette efficacité a par la suite été confirmée dans le cadre de plusieurs essais cliniques (**Figure 7**). Les premières études de phase I puis II et III évaluant l'efficacité de l'IM dans le traitement des GIST en phases avancée et métastatique ont été publiées en 2002 et l'autorisation de mise sur le marché dans cette indication a été obtenue en février 2002 aux Etats-Unis et en juin 2002 en France.

Son efficacité dans les formes métastatiques et le taux élevé de récidive postopératoire de certaines GIST localisées ont naturellement conduit à l'évaluer, en situation adjuvante, pour tenter d'éradiquer une potentielle maladie microscopique résiduelle. Plusieurs études prospectives ont donc été menées et l'IM a obtenu récemment une AMM en situation adjuvante. L'amélioration significative de la survie sans rechute n'est pas identique selon les

sous-groupes de patients. En effet, aucun bénéfice du traitement adjuvant par IM n'a été observé dans les sous-groupes à faible et très faible risque de récidive. C'est pourquoi, l'autorisation d'utilisation européenne a donc été octroyée en 2009 avec un libellé différent de celui des États-Unis : « *Traitement adjuvant des patients adultes qui présentent un risque significatif de rechute après résection d'une tumeur stromale gastro-intestinale GIST KIT (CD117) positive. Les patients qui présentent un faible ou un très faible risque ne doivent pas être traités* ».

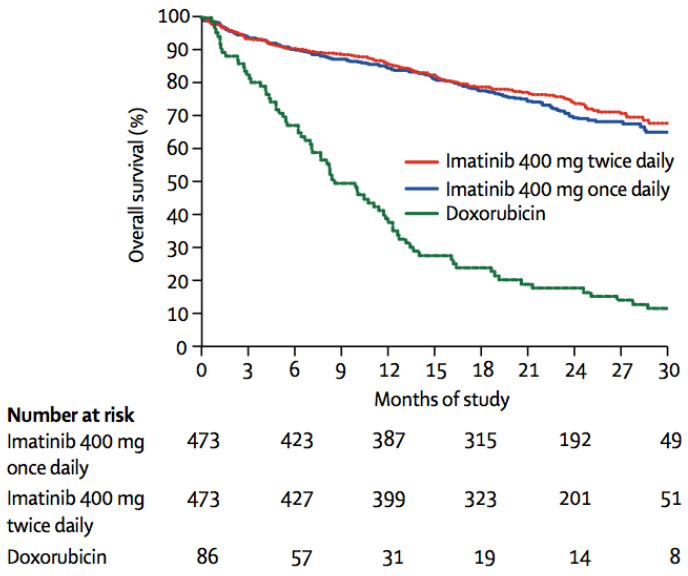


Figure 7 : Courbe de survie globale des patients atteints de GIST et traités par IM à la dose quotidienne de 400 ou 800 mg, ou par doxorubicine. En situation avancée, l'IM a transformé le pronostic des GIST reconnues insensibles aux chimiothérapies conventionnelles. La survie globale médiane des patients en phase avancée est passée de 9 mois environ à plus de 36 mois. D'après Verweij *et al.* 2004 [176].

L'impact du génotype de la tumeur sur le risque de récidive, la sensibilité au traitement adjuvant et le développement d'une réaction immunitaire constituent des axes majeurs de recherche et devraient rapidement permettre de mieux cerner les indications. Définir de nouveaux facteurs pronostiques ou de nouveaux facteurs prédictifs permettra en effet d'aboutir à une meilleure individualisation du traitement systémique. Rappelons que la définition des facteurs pronostiques et prédictifs est théoriquement distincte. Les facteurs pronostiques – basés sur la biologie tumorale, la morphologie, le suivi – permettent d'identifier des patients à haut risque de récidive. Leur puissance est indépendante du traitement. Les facteurs prédictifs concernent les modifications spécifiques permettant de prédire un bénéfice à un traitement particulier. Ils sont corrélés à la réponse au traitement et doivent être capables de sélectionner des patients pour un type de molécule.

En pratique, les facteurs pronostiques permettent de mieux identifier les patients à traiter, et les facteurs prédictifs permettent de mieux sélectionner les traitements adéquats (**Tableau 5**). Certains marqueurs pronostiques peuvent également être prédictifs.

Tableau 5 : Distinction entre facteurs pronostiques et prédictifs.

Facteurs pronostiques	Facteurs prédictifs
Basés sur la biologie tumorale	Basés sur l'interaction entre le traitement et la biologie tumorale
Corrélés à la survie indépendamment du traitement	Corrélés à la réponse au traitement indépendamment du pronostic
Permettent de sélectionner les patients à risque	Permettent de sélectionner des patients pour un traitement spécifique
Largement appliqués sur de grandes populations, impact clinique à discuter	Impact significatif sur des patients sélectionnés
Nombreux identifiés et validés	Peu identifiés et validés
Ex : taille tumorale, index mitotique, localisation initiale des GIST [177]	*Ex : la présence de métastases pulmonaires prédit la survenue d'une résistance précoce à l'IM dans le GIST* [178]

Syndrome hyperéosinophilique

L'hyperéosinophilie se rencontre dans un nombre très varié de situations pathologiques. Lorsqu'aucune cause n'est mise en évidence après un bilan étiologique exhaustif, on évoque alors le diagnostic de syndrome hyperéosinophilique (SHE).

Ce syndrome hétérogène regroupe des variants myéloïde et lymphoïde qui ont en commun l'existence de lésions tissulaires induites par les polynucléaires neutrophiles mais qui se caractérisent par des bases moléculaires spécifiques. Le variant myéloïde est parfois associé à des délétions chromosomiques aboutissant à la fusion entre les gènes FIP1L1 (*FIP1 like 1*), et PDGFRα. Ce transcrit de fusion FIP1L1-PDGFRα possède une activité tyrosine kinase constitutionnelle.

Plusieurs études faites chez des patients atteints d'un SHE et/ou d'une leucémie chronique à éosinophiles (LCE) associés à un réarrangement du FIP1L1-PDGFRα, montrent une efficacité spectaculaire de l'IM [179-181]. Depuis 2006, l'IM a donc obtenu l'extension d'indication pour le traitement des patients adultes atteints d'un SHE à un stade avancé et/ou d'une LCE associés à un réarrangement du FIP1L1-PDGFR.

Dermatofibrosarcoma protuberans

Les DFSP – aussi dénommées dermatofibrosarcomes de Darier-Ferrand – sont des sarcomes cutanés de malignité intermédiaire, caractérisés par une forte agressivité locale et un potentiel métastatique faible mais réel [182].

Les DFSP sont caractérisées par une translocation spécifique entre le chromosome 17 et le chromosome 22 : t(17;22) (q22;q13). Cette translocation, qui entraîne une surexpression du PDGFβ, serait à l'origine de la transformation maligne dans cette pathologie [183].

Cette particularité moléculaire des DFSP a des conséquences diagnostiques et surtout thérapeutiques. Des études *in vitro* testant l'activité antitumorale de l'IM ont montré une régression de la prolifération en présence de celui-ci [183,184]. Plusieurs cas de DFSP non résécables et/ou métastatiques traités par IM ont été rapportés dans la littérature [184-191]. L'IM a été utilisé à des doses de 400 ou de 800 mg par jour. Dans une série de 10 cas de DFSP [184], 5 patients ont eu une réponse complète et 4 une réponse partielle. Parmi ces 10 patients, 8 avaient une récidive locale porteuse de la translocation t(17;22) et 2 une rechute métastatique ; la tumeur de l'un de ces deux patients n'avait pas la translocation t(17;22) et n'a pas répondu au traitement. Ces données confirment *in vivo* que le PDGFR est bien la cible de l'IM dans les DFSP et que seules les tumeurs présentant la translocation t(17;22) répondent. La preuve conceptuelle étant faite, il reste à définir le rôle exact de l'IM dans la prise en charge des DFSP, et notamment son rôle potentiel en situation pré-opératoire pour les tumeurs non résécables d'emblée.

Imatinib : un développement clinique sans précédent

Le développement de l'IM est donc remarquable à plus d'un titre. D'abord, il s'agit de la première thérapeutique réellement ciblée sur la cellule cancéreuse puisqu'il inhibe l'activité tyrosine kinase d'une protéine oncogénique n'existant que dans les cellules tumorales. Certes, les cibles de certaines chimiothérapies sont définies avec la plus grande précision au niveau moléculaire : 5-FU et thymidilate synthétase, méthotrexate et dihydrofolate réductase, alkylants et ADN. Mais ces cibles sont communes à toutes les cellules et par conséquent, ces traitements anticancéreux n'épargnent pas les tissus sains. De plus, le développement préclinique de l'IM a été des plus rapides puisqu'il ne s'est écoulé que 5 ans entre la synthèse de l'IM et le premier essai clinique. La commercialisation, intervenue seulement trois ans après le début de la première étude clinique, a également été très rapide. Ce développement accéléré a été rendu possible par l'excellente tolérance et l'efficacité immédiate de ce traitement, ce qui – comparées aux chimiothérapies conventionnelles – en fait également un traitement remarquable. Enfin, sur le marché depuis seulement quelques années, l'IM a bénéficié de nombreuses extensions d'indications notamment pour le traitement des patients atteints de GIST, SHE et DFSP.

Afin d'étendre les indications de ce traitement, de nouvelles études sont nécessaires pour approfondir le mécanisme d'action de l'IM. Notamment, la question du retentissement de l'IM sur les réponses immunes est d'actualité et a fait l'objet de nombreuses observations – parfois contradictoires – chez l'homme et de travaux plus fondamentaux.

Imatinib et immunomodulation

Bien que plusieurs travaux rapportent un rôle immunosuppresseur de l'IM par le biais d'actions sur les cellules présentatrices d'antigènes et des LT, d'autres études suggèrent au contraire que l'IM pourrait jouer un rôle de stimulateur du système immunitaire (**Tableau 6**).

Observations cliniques

Quelques rares observations cliniques chez l'homme ou chez l'animal mentionnent un effet immunosuppresseur de l'IM. Chez le rat traité pendant 2 ans à des doses de 30 à 60 mg/kg/jour d'IM, une fréquence accrue de tumeurs génito-urinaires a été observée [192]. Chez le rat toujours, l'IM est susceptible d'empêcher la survenue de bronchiolite oblitérante après allogreffe « *mismatch* » de trachée [193] ou de néphropathie chronique secondaire à une allogreffe « *mismatch* » de rein [194]. Dans le modèle de souris lupique, l'administration d'IM diminue l'incidence de glomérulopathie mais également le degré d'inflammation sur d'autres sites comme les glandes salivaires, et fait également décroître le taux d'IgG circulantes ainsi que le taux d'auto-anticorps [195]. L'ensemble de ces observations ferait intervenir comme cible le PDGFR à la surface des cellules mésenchymateuses ou musculaires lisses plutôt qu'un effet direct sur les cellules du système immunitaire. Le PDGFR semble en effet impliqué dans la physiopathologie de la bronchiolite oblitérante [196], de la néphropathie chronique de l'allogreffe [197] et plus généralement dans les pathologies rénales [198].

Dans une cohorte de 771 patients traités par IM, 16 patients (2%) ont développé un zona [199]. Ces 16 patients avaient été traités significativement plus longtemps par IM que les patients ne développant pas de zona, mais ils avaient également reçu plus de traitements préalables pour la LMC. Pourtant, l'incidence des infections pendant un traitement par IM reste relativement faible [200]. De plus, une autre étude visant à évaluer la réactivation du cytomégalovirus (CMV) chez des patients greffés n'a pas mis en évidence d'impact de l'IM : le taux de réactivation du CMV est identique, que les patients soient traités ou non par IM [201]. A ce jour, chez l'homme, aucune augmentation de l'incidence de cancer n'a été rapportée sous IM.

Tableau 6 : Effets immunomodulateurs observés après un traitement par IM.

	Modèle	Pathologie		Cellules cibles	Effets observés	Références
Activation de l'immunité	Patients	LMC	*in vitro* *in vivo*	CD34	Restauration de la fonction des pDC	202
	Patient	LMC	*in vitro*	DC	Augmentation des molécules de co-stimulation Amélioration de la présentation de l'Ag	203
	Animal	Sain	*in vivo*	DC	Inhibition c-kit des DC Activation des NK ($CD69^+$ / IFN-γ / lyse)	204
	Patients	GIST	*in vivo*	DC	Activation des NK augmentée et corrélée à la réponse clinique	204, 205
	Patients	GIST	*in vivo*	NK	Profil d'expression du récepteur NKp30 représente des facteurs de bon pronostic	206
	Animal	Sain	*in vitro*	DC, LT	Améliore la présentation de l'Ag par les DC Améliore l'activation des LT $CD4^+$	207
	Animal	A20HA	*in vivo*	DC, LT	Supression de l'état de tolérance de LT $CD4^+$ Amélioration de l'efficacité vaccinale	207
	Animal	12B1	*in vivo*	LT	Potentialise l'activation de LT antileucémique après vaccination par des DC chargées avec des lysats cellulaires	208
	Patient	LMC	*in vivo*	LT	Augmentation du taux de LT producteurs d'IFNγ+	209
	Patient	LMC	*in vivo*	LT	Pas d'altération de la réponse LT spécifique anti-tumorale après vaccination par CMLVAX100 (peptide dérivé de BCR-ABL + adjuvant)	210, 211
	Patients	LMC	*in vivo*	LT	Activation de LT antileucémique	212
	Animal	GIST	*in vivo*	LT	Prolifération et activation de LT CD8+	213
	Patients	GIST	*in vivo*	LT	Augmentation de LT CD8+ corrélée à la réponse clinique	213
	Patients	LMC	*in vivo*	LB	Augmentation d'une population de LB $CD20^+CD5^+sIgM^+$ corrélée à la réponse clinique	214
	Cellules humaines	Volontaires sains	*in vitro*	Treg	Inhibition de la prolifération des Treg	215, 216
	Animal	Sain	*in vivo*	Treg	Inhibition de l'activité immunosuppressive des Treg	215
	Animal	GIST	*in vivo*	Treg	Diminution des Treg intra-tumoraux par inhibition de la protéine IDO	213
	Patients	GIST	*in vivo*	Treg	Diminution des Treg intra-tumoraux corrélée à une diminution de l'expression IDO	213
Immunosuppression	Animal	Sain	*in vitro*	LT	Inhibition de la prolifération	217-220
	Animal	Sain	*in vivo*	LT	Inhibition d'une réaction d'hypersensibilité retardée	218
	Animal	RMA-S MCA 102	*in vivo*	DC	Inhibition de l'expansion des DC par Flt3-L	221
	Cellules humaines	Volontaires sains	*in vitro*	CD34+	Inhibition de la différention en monocytes	222-224
	Cellules humaines	Volontaires sains	*in vitro*	CD34+	Inhibition de la différentiation en DC Diminutaion de la capacité des DC à activer une réponse lymphocytaire spécifique	225, 226
	Cellules humaines	Volontaires sains	*in vitro*	CD34+	Inhibition de la prolifération des progéniteurs hématopoïétiques CD34+	227
	Animal	*L. mono-cytogenes*	*in vivo*	LT	Diminution de la réponse secondaire des LT CD8+	228

Imatinib et hématopoïèse

Les effets de l'IM sur l'hématopoïèse sont nombreux. L'interprétation des données *in vivo* chez les patients atteints de LMC est toujours rendue délicate par le fait que l'hématopoïèse au diagnostic est très majoritairement d'origine leucémique. Il n'est donc pas exceptionnel de voir le patient devenir très cytopénique sous l'effet de l'IM, effet réversible au bout de quelques semaines à quelques mois et attribué au délai de la reprise de fonction d'une hématopoïèse normale [229]. Dans des pathologies comme les GIST où l'hématopoïèse est normale, des neutropénies et des anémies sont rapportées ; elles restent cependant modérées : 7% de neutropénie grade 3-4 et 14% d'anémie grade 3-4 [178]. Le retentissement de l'IM sur les autres lignées cellulaires est moins rapporté. Chez des patients préalablement traités par IFN-α, le développement d'une hypogammaglobulinémie IgG, IgA et IgM a été observé chez environ un quart des patients [230].

Imatinib et cellules présentatrices d'antigène

Plusieurs études suggèrent une inhibition de la dendritopoïèse myéloïde et plasmacytoïde par l'IM, ainsi qu'une inhibition du processus de maturation des DC. L'IM a un effet inhibiteur sur la prolifération des progéniteurs hématopoïétiques $CD34^+$: l'expansion de ces cellules en présence de SCF, Flt3-L, TPO, IL3, IL-6 et G-CSF est en effet inhibée de façon dose-dépendante *in vitro* dès la dose de 0,1 μM, plus de 10 fois inférieure à celle observée en clinique [227]. Appel *et al.* rapportent également un effet inhibiteur de l'IM sur la différentiation de cellules souches hématopoïétiques $CD34^+$ en DC en présence de GM-CSF, IL4, TNF-α et Flt3-L [225]. Dans cette étude, l'IM testé à des concentrations thérapeutiques (1-5 μM) retentit sur l'acquisition des marqueurs de différentiation de la DC comme CD1a, et sur l'acquisition de molécules de co-stimulation comme CD80 et CD40. Chez la souris, l'administration d'IM inhibe l'expansion des DC par Flt3-L alors que le récepteur Flt3 n'est pas une cible de l'IM [221]. Cet effet s'accompagne d'une diminution de l'effet antitumoral du Flt3-L. L'IM inhibe également *in vitro* la maturation et la différentiation des DC dérivés de monocytes (Mo-DC : *monocyte-derived DC*) [226]. Les Mo-DC maturées en LPS présentent des anomalies d'expression de CD1a, CD86, CD80 et CD40 ainsi que des défauts d'expression d'IL-12, de chimiokines comme CCL2 (*chemokine (C-C motif) ligand-2*), CCL3 (MIP1a) et CCL5. Ces Mo-DC perdent de plus la capacité d'induire une réponse T spécifique. L'action de l'IM ferait intervenir les facteurs de transcription de la famille NF-κB, RelA, RelB impliqués dans la différentiation et la fonction des DC [231,232], ainsi que la voie PI3K/Akt. D'autres études ne rapportent qu'une inhibition modérée de l'expression d'IL-12 sans

anomalie phénotypique de différentiation et de maturation [217]. Il est probable que les modalités de préparation de ces DC (CD34 ou monocyte, purification, cocktail de différentiation et d'activation) expliquent ces disparités. La différenciation *in vitro* de CSH $CD34^+$ en monocytes est également inhibée par l'IM à des concentrations équivalentes à celles employées en clinique [222-224].

D'autres études suggèrent au contraire un effet immunostimulant de l'IM impliquant les DC. Wang *et al*. montrent que l'IM améliore la présentation de l'antigène par des DC murines dérivées de la moelle osseuse (BM-DC : *bone marrow-derived DC*), restaurant ainsi la réactivité de LT spécifique de la tumeur [207]. Dans un modèle de leucémie murine BCR-ABL^+ (12B1), l'IM potentialise l'immunothérapie antitumorale à base de DC chargées avec des lysats cellulaires riches en protéines chaperonnes [208]. Là encore, l'administration d'IM augmente la production d'IFN-γ par les LT cytotoxiques spléniques, ainsi que la fréquence des précurseurs cytotoxiques. Enfin, les patients atteints de LMC présentent des anomalies quantitatives et qualitatives des pDC (*plasmocytoid DC*) mais un traitement efficace par IM entraine une restauration progressive de la fonction des pDC [202]. En effet, les patients en rémission cytogénétique complète montrent une fonction des pDC normale alors qu'en cas de mauvaise rémission cytogénétique leur nombre et leur fonction restent altérés. *In vitro*, l'IM favorise la dendritopoïèse des pDC à partir des cellules souches hématopoïétiques $CD34^+$.

Effets de l'Imatinib sur les fonctions lymphocytaires

L'action inhibitrice de l'IM sur la prolifération lymphocytaire T est bien démontrée *in vitro* [217-220]. Cette inhibition de prolifération n'est pas spécifique de l'antigène ; elle est également observée après stimulation par PHA (*phytohemagglutinin*) ou anti-CD3/CD28 [217,219]. L'IM n'agit pas en induisant un excès d'apoptose mais plutôt en diminuant la transduction du signal TCR puisqu'il a pu être observé une déphosphorylation de Lck (*leukocyte-specific protein tyrosine kinase*), une inactivation NF-κB et une inhibition de la phosphorylation de ERK1/2 (*Extracellular Signal-Regulated Kinases 1 and 2*) et de ZAP70 (*Zeta-chain-associated protein kinase 70*) [218,219]. Concernant les marqueurs d'activation CD25 et CD69 et la production d'IFNγ, plusieurs études sont contradictoires : certains ne montrent pas d'effet de l'IM sur ces différents paramètres [217,218] alors que d'autres soulignent une diminution de ces marqueurs en présence d'IM [219,233]. Pour autant, il semble qu'*in vitro* les fonctions cytolytiques des LT ne soient pas affectées par des doses d'IM compatibles avec celles utilisées en clinique [233].

D'ailleurs, *in vivo,* les effets de l'IM sur les populations lymphocytaires ne sont pas en faveur d'une immunosuppresion. En effet, l'IM n'empêche pas le développement des réponses primaires B et T ainsi que la clairance virale faisant suite à la primo-infection par le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV) et de la stomatite vésiculaire (VSV) [234]. Toutefois, l'IM inhibe l'expansion des LT mémoires et retarde la clairance virale chez des souris exposées au virus après transfert de LT mémoires spécifiques du virus. Cet effet inhibiteur de l'expansion lymphocytaire T mémoire ne semble pas s'accompagner d'une modulation d'expression d'IFN-γ ou de TNF-α [234]. Sinai *et al*. ont corroboré ces résultats en montrant que l'IM affecte la réponse secondaire – mais pas la réponse primaire – des LT $CD8^+$ au pathogène *L. monocytogenes* [228]. Dans un essai clinique de vaccination à partir de peptide dérivé de p210 (protéine BCR-ABL la plus fréquente), Bocchia *et al.* ont comparé les effets à long terme d'un traitement par IM ou IFN-α. Le taux de réponse – mesuré par le test d'hypersensibilité retardé et par un test de prolifération *in vitro* des LT $CD4^+$ – est comparable dans les deux bras [211]. Cette étude est la première qui aurait pu mettre en évidence un potentiel effet immunosuppresseur de l'IM *in vivo*. Mais les résultats indiquent que l'IM ne compromet pas les fonctions des LT impliquées dans une réponse immunitaire dirigée contre un peptide faiblement immunogène [210,211]. Certaines études *in vivo* mettent en évidence un effet immunostimulateur de l'IM. Les patients réfractaires ou intolérants à l'IFN-α augmentent leur taux de cellules T productrices d'IFN-γ sous IM [209]. Après un traitement par IM, la majorité des patients en rémission complète de leur LMC montre une réponse immunitaire anti-leucémique, principalement médiée par des LT $CD4^+$ sécrétant du TNF [212]. Une autre étude a également montré l'augmentation d'une population de LB $CD20^+CD5^+sIgM^+$ dans la moelle de patients atteints de LMC et traités par IM [214]. De manière intéressante, cette population de LB est corrélée à la réponse clinique : seuls les patients en rémission cytogénétique ou moléculaire voient le taux de LB $CD20^+CD5^+sIgM^+$ augmenter. Une augmentation du taux d'IgM possédant une activité anti-leucémique est également observée chez ces patients répondeurs. L'efficacité thérapeutique de l'IM pourrait donc être en partie liée à l'augmentation de cette population de LB $CD20^+CD5^+sIgM^+$ sécrétant des anticorps anti-leucémiques. Dans un modèle murin de GIST, Balachandran *et al.* montrent que l'IM augmente le nombre et l'activation des LT $CD8^+$ dans les ganglions drainant la tumeur ainsi que dans la tumeur [213].

La déplétion sélective des LT $CD8^+$ diminue l'efficacité antitumorale de l'IM, mettant ainsi en évidence le rôle majeur des LT $CD8^+$ dans l'effet antitumoral de l'IM. Ce modèle

semble corroboré chez l'homme où l'augmentation des LT $CD8^+$ est également retrouvée au sein de GIST sensibles à l'IM.

Effets de l'Imatinib sur les lymphocytes T régulateurs

Plusieurs études récentes ont étudié l'effet de l'IM sur les Treg. *In vitro*, l'IM inhibe la prolifération des Treg, diminue l'expression de GITR, CD69, Foxp3 et CTLA-4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4*) sur les Treg. En conséquence, les Treg sont plus sensibles à l'apoptose et voient leurs propriétés immunosuppressives diminuées par l'IM de manière dose-dépendante [215,216]. Une étude murine confirme l'inhibition des Treg suite à un traitement par IM [215]. Cette inhibition des fonctions Treg résulte de la diminution d'expression de Foxp3 suite à un défaut de phosphorylation de STAT3 et STAT5.

L'inhibition des Treg par l'IM est également corroborée à partir de modèles murins de GIST. L'IM en diminuant l'expression tumorale de l'enzyme IDO, augmente l'apoptose des Treg intra-tumoraux et diminue ainsi leur effet immunosuppresseur [213]. Chez l'homme, l'infiltrat tumoral des GIST varie selon que les tumeurs sont classées sensibles ou résistantes à l'IM : les tumeurs sensibles à l'IM montrent une augmentation des LT $CD3^+$ et $CD8^+$ alors qu'une diminution des Treg est observée. Cette variation du ratio intra-tumoral $CD8^+$ / Treg est corrélée à une diminution de l'expression de l'ARNm IDO [213].

Effets de l'Imatinib sur les fonctions NK

De façon intéressante, une fraction de patients atteints de GIST ne portant pas de mutations activatrices ni pour c-kit, ni pour PDGFR répond tout de même à l'IM [204]. Cette efficacité thérapeutique de l'IM a en partie été attribuée à son effet activateur des cellules NK. En effet, l'IM permet d'obtenir *in vivo* des effets antitumoraux sur des tumeurs ne répondant pas à ce même traitement *in vitro* [235]. Le mécanisme impliqué est une inhibition de c-kit sur les DC, qui secondairement entraine une activation des cellules NK, pouvant ainsi exercer une activité cytotoxique sur les cellules de GIST.

Plusieurs résultats cliniques corroborent l'implication des NK dans l'efficacité antitumorale de l'IM. Borg *et al.* montrent une augmentation de l'activation des NK après traitement par IM chez 9 des 11 patients testés. Cette activation de l'activité NK est de plus corrélée à une meilleure survie des patients atteints de GIST [204,205]. L'expression du récepteur activateur NKp30 est également restaurée après plusieurs mois de traitement par IM [205]. De manière intéressante, il existe plusieurs isoformes de ce récepteur qui se distinguent par des domaines intra-cytoplasmiques spécifiques et des fonctions biologiques bien distinctes. L'isoforme NKp30a induit la sécrétion de cytokine de type Th1 (IFN-γ, TNF-α) et la

dégranulation des NK, l'isoforme NKp30b induit seulement la sécrétion de cytokine de type Th1 (IFN-γ, TNF-α), alors que l'isoforme NKp30c induit la sécrétion de la cytokine immunosuppressive IL-10 [206]. Le profil d'expression de NKp30 est pronostique chez les patients GIST : les patients avec l'expression prédominante de l'isoforme NKp30c ont une plus faible survie globale que les patients avec une expression prédominante des isoformes NKp30a et NKp30b [206].

Cibles de l'Imatinib

L'action de l'IM sur le système immunitaire est donc complexe. Il est d'autant plus difficile de relier l'ensemble des observations *in vitro* et *in vivo,* chez l'homme et chez l'animal que, dans la plupart des cas, l'identification de la cible moléculaire de l'IM fait défaut et que, de surcroît, celle-ci est probablement de nature multiple.

Parmi les cibles potentiellement impliquées dans les effets « off-target » de l'IM, le récepteur tyrosine kinase c-kit tient tout de même une place de choix. La voie de signalisation c-kit/SCF joue en effet un rôle primordial dans différentes fonctions biologiques dont l'hématopoïèse. Le récepteur c-kit est exprimé de manière constitutive par les cellules souches hématopoïétiques et de façon générale, la signalisation par ce récepteur joue un rôle essentiel dans la régulation de la prolifération cellulaire et la survie des cellules souches hématopoïétiques [236]. Pour la majorité des lignées hématopoïétiques, l'étape de maturation est par contre caractérisée par une perte de l'expression du récepteur c-kit [237]. Ainsi, au niveau périphérique seul une minorité des cellules NK exprime le récepteur c-kit [238]. L'analyse phénotypique et fonctionnelle des cellules NK c-kit^{+} a permis de montrer d'une part, que l'expression de ce récepteur est restreinte aux cellules CD56^{bright} et d'autre part, que ces cellules NK CD56^{bright}/c-kit^{+} ont une activité cytolytique plus faible que les cellules NK CD56^{bright}/c-kit^{-} [238,239]. *In vitro*, de fortes doses de SCF n'induit pas d'effet majeur sur la prolifération ou l'activité cytotoxique de cellules NK CD56^{bright} isolées à partir de cellules mononucléées du sang périphérique. De même, le blocage de la voie c-kit/SCF via l'IM n'augmente pas la sécrétion d'IFN-γ par les cellules NK murines [204]. Il semble donc peu probable que l'effet de l'IM sur l'activation cellules NK se fasse via l'inhibition directe du récepteur c-kit présent à la surface des cellules NK.

L'une des hypothèses envisagées est un mécanisme indirect nécessitant l'inhibition du récepteur c-kit présent à la surface des DC. En effet, dans un modèle murin, l'IM améliore la sécrétion d'IFN-γ par les cellules NK seulement en présence de BM-DC et selon un mécanisme dépendant de la voie c-kit [204]. De plus, l'activation du récepteur c-kit exprimé à la

surface des DC polarise la réponse immune des LT auxiliaires. En effet, suite à une stimulation par le SCF, les DC c-kit$^+$ sécrètent de fort taux d'IL-6 et expriment Jagged-2 avec pour conséquence d'orienter la différenciation des LT CD4$^+$ naïfs en cellules Th2 ou Th17 [240]. Dans un modèle animal d'asthme allergique, les LT CD4$^+$ mis en culture avec les DC c-kit$^-$ sécrètent majoritairement des cytokines IL-13 et IL-17 et peu d'IFN-γ alors qu'en présence de DC c-kit$^-$, les LT CD4$^+$ sécrètent principalement de l'IFN-γ et peu d'IL-13 ou d'IL-17. De même, lorsque la voie c-kit est altérée (modèle W/W-v : mutation avec perte de fonction de la protéine c-kit), les DC sécrètent moins d'IL-6 et expriment peu Jagged-2 par rapport aux souris WT. Ce profil d'expression des cytokines est également retrouvé *in vivo*, puisqu'au niveau des ganglions lymphatiques de souris W/W-v, on observe une diminution des cytokines IL-6, IL-13 et IL-17 ainsi qu'une diminution des LT et des polynucléaires éosinophiles par rapport aux souris WT. Ces données laissent à penser que l'utilisation chronique de l'IM pourrait reproduire ce phénotype W/W-v et donc promouvoir une réponse immunitaire Th1 et ainsi favoriser l'instauration d'une réponse immunitaire antitumorale.

Imatinib et immunothérapie

Dans l'ensemble, les données obtenues chez l'homme – et plus particulièrement celles obtenues à partir des GIST – sont plutôt en faveur d'une contribution du système immunitaire dans l'efficacité de l'IM. Afin d'améliorer la réponse clinique, l'association de l'IM à une immunothérapie pourrait donc s'avérer intéressante. Des essais de phase précoce associant l'IM à des protocoles d'immunothérapie spécifique à base d'antigènes ou de DC sont d'ailleurs en cours d'évaluation dans la LMC. Un essai de phase I a également mis en évidence l'intérêt de combiner l'IM à l'IFN-α dans une cohorte de 8 patients atteints de GIST [241]. Cette étude montre une augmentation significative de la réponse Th1 et de l'activation des NK associées à des bénéfices cliniques très prometteurs.

Rationnel d'un traitement par l'association IM et IL-2

Afin d'améliorer l'efficacité antitumorale, et plus particulièrement l'efficacité antitumorale médiée par les cellules NK, notre équipe de recherche a également fait le choix de combiner l'IM à une cytokine : l'interleukine-2 (IL-2). Depuis leur découverte en 1975, de nombreux arguments démontrent en effet le rôle primordial des cellules NK dans le contrôle tumoral et soutiennent un intérêt important de leur utilisation en immunothérapie des cancers.

Cancer et cellules NK

Les NK, d'origine lymphoïde, sont des cellules effectrices de l'immunité innée. Elles jouent un rôle essentiel dans la défense de l'hôte notamment grâce à leur potentiel cytotoxique. La cytotoxicité des cellules NK envers les cellules tumorales s'exerce sans reconnaissance spécifique d'antigènes sur la cellule cible. Les cellules NK possèdent en effet deux grands types de récepteurs : les récepteurs dits "activateurs" et ceux dits "inhibiteurs". Lors du contact cellulaire entre la cellule NK et la cellule cible, l'intégration des différents signaux induit leur activité cytotoxique ou au contraire leur tolérance (**Figure 8**).

La lyse induite par les cellules NK peut être médiée par la sécrétion d'IFN-γ, l'exocytose de granules cytotoxiques (granzyme B et perforine) et l'apoptose induite par les récepteurs de mort (TRAIL et Fas/FasL). En parallèle, les cellules NK sécrètent des cytokines et chimiokines (IFN-γ, TNF-α, CCL3, CCL4, CCL5), recrutant et activant les acteurs de l'immunité innée (macrophages, DC) et adaptative (LT) [242].

Plusieurs études ont démontré l'importance des cellules NK dans l'immunité antitumorale (**Annexe 3**). L'une des premières – réalisée en 1980 – montre une augmentation de la croissance tumorale associée à un plus grand potentiel métastatique chez des souris déficientes en cellules NK [243]. Par la suite, des études réalisées sur des souris déplétées en cellules NK par utilisation d'un anticorps monoclonal anti-NK1.1, ont confirmé le rôle des NK. Ces souris sont deux à trois fois plus sensibles que les groupes sauvages à la formation de tumeurs induites par MCA [18]. Des expériences de transfert adoptif confortent le rôle protecteur des cellules NK qui restaurent la résistance aux métastases [18,26,244,245]. Chez l'homme, l'existence d'une immunosurveillance exercée par les cellules NK a également été démontrée. Une étude japonaise s'est intéressée à la corrélation entre l'efficacité cytotoxique des cellules immunitaires et l'incidence du cancer sur une population de 3625 patients pendant une durée de 11 ans. Les conclusions indiquent que les patients possédant une faible cytotoxicité cellulaire ont un risque accru de développer des cancers [51]. L'activité des cellules

NK dans le sang périphérique est donc directement corrélée au risque de développer une tumeur. L'infiltration au sein des tumeurs par les cellules NK a d'ailleurs été corrélée à un meilleur pronostic dans divers types de cancers [246].

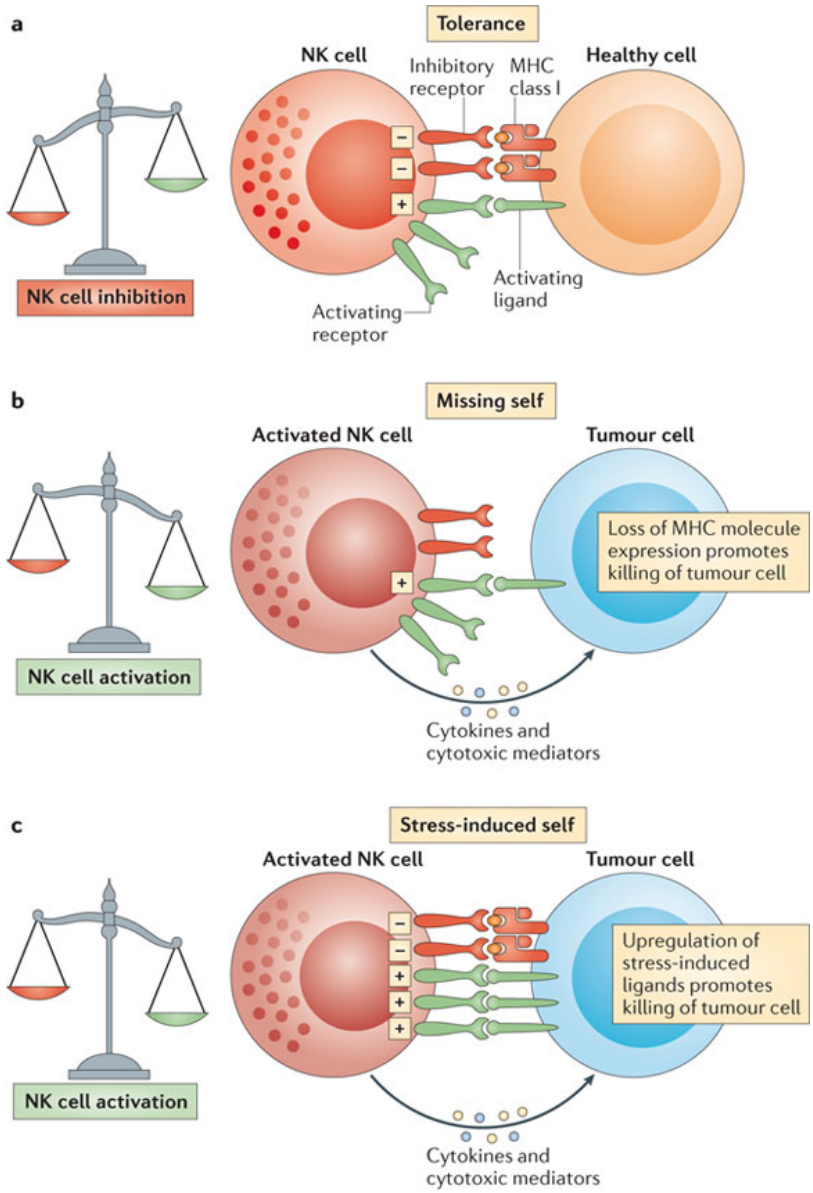


Figure 8 : L'activation de l'action cytotoxique des cellules NK dépend de l'équilibre entre signaux activateurs et inhibiteurs. **a.** Dans des conditions normales, une cellule saine présente à sa surface le ligand activateur et les molécules du CMH-I. Le récepteur activateur est donc activé de manière permanente mais la transmission du signal est inhibée par la liaison des molécules du CMH-I au récepteur inhibiteur. **b.** Les cellules tumorales peuvent perdre l'expression des CMH-I. En l'absence de signaux inhibiteurs, les cellules NK deviennent alors activées en réponse à ces cellules. Ce processus est appelé « missing-self ». **c.** De plus, les cellules NK sont sélectivement activées par les cellules stressées qui augmentent l'expression de ligands activateurs. D'après Vivier, *et al.* 2012 [247].

Mais si leur rôle est essentiel dans le contrôle tumoral, les fonctions NK sont néanmoins souvent altérées chez les patients atteints de cancer (**Tableau 7**). Plusieurs études ont en effet décrit une diminution de l'activité cytotoxique, un défaut d'expression des récepteurs activateurs ou de production de cytokine. Les thérapies visant à restaurer l'activité des cellules NK pourraient donc être bénéfiques à de nombreuses pathologies cancéreuses.

Tableau 7 : Défauts des fonctions NK dans les cancers. D'après Sutlu *et al* [248].

Défauts des fonctions NK	Pathologies	Réf.
Diminution de l'activité cytotoxique des NK	Cancer pulmonaire non à petites cellules	249
	Carcinome hépatocellulaire	250, 251
	Adénocarcinome rectal	252
	Cancer de la tête et du cou	253
	Cancer du sein	253
	Cancer du col de l'utérus	254
	Cancer de l'ovaire	255
	Leucémie aigüe lymphoïde	256, 257
	Myélome multiple	258
	Leucémie aigüe myéloïde	256
Diminution de l'expression des récepteurs activateurs	Carcinome hépatocellulaire	250
	Mélanome métastatique	259
	Leucémie aigüe myéloïde	260
	Myélome multiple	261, 262
Diminution de la prolifération des NK	Carcinome à cellules rénales métastatiques	263
	Cancer nasopharyngé	264
	Leucémie myéloïde chronique	265
Diminution de la production de cytokine	Leucémie aigüe myéloïde	256
	Leucémie myéloïde chronique	266
	Leucémie aigüe lymphoïde	256, 257
Diminution du nombre de NK	Cancer nasopharyngé	264
	Leucémie myéloïde chronique	265

Imatinib et dialogue NK/DC

Comme évoquée précédemment, une partie de l'efficacité antitumorale de l'IM est médiée par les cellules NK [204]. En effet, l'IM améliore le dialogue entre les DC et les cellules NK conduisant à une augmentation de la sécrétion d'IFN-γ et de TNF-α par les cellules NK et d'IL-12 par les DC [204,205]. Ces effets de l'IM sur le système immunitaire constituent un facteur pronostique indépendant et sont corrélés à une augmentation de la survie sans récidive dans les GIST [205,206].

Interleukine-2 : adjuvant des NK

L'IL-2 est une cytokine Th1 agissant sur de nombreuses cellules et en particulier sur les NK. L'IL-2 joue notamment un rôle majeur dans la prolifération des NK et leur activation cytotoxique [267] en augmentant la production de perforine [268] et l'expression de TRAIL [269].

In vitro, l'activation des NK par l'IL-2 accroit leur potentiel lytique à l'encontre de cellules tumorales [270]. L'IL-2 peut également restaurer l'activité cytotoxique des NK dirigée contre des cellules tumorales qui jusque là étaient NK-résistantes [271,272]. A partir de modèles

animaux, de nombreux travaux de recherche effectués montrent l'intérêt de l'IL-2 dans l'acquisition d'une réponse immunitaire antitumorale [273-280]. Souvent attribuée aux LT cytotoxiques, cette efficacité antitumorale de l'IL-2 est également le fait des NK [281-285]. Dans un modèle de souris SCID (*severe combined immunodeficience*, souris présentant une lymphopénie B et T profonde), le rejet de xénogreffes pulmonaires consécutives à l'administration d'IL-2 est également médié par les NK [284]. Enfin, dans un modèle murin du myélome multiple, Alici *et al.* montrent que l'IL-2 prolonge la survie des souris et que les NK sont les principaux effecteurs de cette réponse clinique [285].

Chez l'homme, différentes voies de recherche actuellement développées en immunothérapie des cancers montrent l'intérêt de l'IL-2 : que ce soit seul [274,286,287] ou en association avec d'autres cytokines, [288,289], l'administration d'IL-2 induit une augmentation du nombre de NK et de leur activité cytotoxique. Bien que dans l'ensemble l'efficacité de ces traitements soit modeste, certaines études montrent une corrélation entre la réponse clinique et l'augmentation des NK [288,290,291].

Efficacité de l'association Imatinib / Interleukine-2

De manière à améliorer l'activation des NK induite par l'IM, il a donc été proposé de l'associer à l'IL-2. Pour cela, deux modèles murins – métastases pulmonaires du mélanome B16F10 et cancer colique CT26 – ont été traités par IM, IL-2 ou la combinaison des deux. Dans ces deux modèles, l'association IM+IL-2 synergise et ralentit significativement la croissance tumorale, alors que chaque médicament utilisé séparément ne permet pas d'obtenir une efficacité comparable (**Figure 9**) [292,293]. Cet effet est NK-dépendant comme le suggère la perte d'efficacité après déplétion des cellules NK.

IKDC : *interféron producing killer dendritic cells*

Plusieurs travaux de recherche ont été conduits afin d'approfondir les mécanismes impliqués dans l'efficacité antitumorale de l'association IM+IL-2. Dans un modèle murin, ils ont notamment permis de mettre en évidence l'expansion d'une population de cellules immunitaires au sein des tumeurs [292]. Ces cellules, appelées IKDC (*interferon producing killer dendritic cells*), en raison de leurs caractéristiques phénotypiques proches des DC myéloïdes et de leur capacité cytolytique et de production d'IFN-γ étaient jusqu'à présent passées inaperçues du fait de leur rareté.

Les IKDC sont faiblement représentées dans des animaux non traités alors qu'elles sont fortement amplifiées lorsque les animaux sont traités par IM et IL-2. Elles sont notamment capables de s'accumuler au niveau tumoral où elles sécrètent de l'IFN-γ et lysent

les cellules tumorales de manière TRAIL-dépendante [292]. Des expériences de transfert adoptif d'IKDC dans des souris $Rag^{-/-}$ confirment leur rôle dans le contrôle de la croissance tumorale [292].

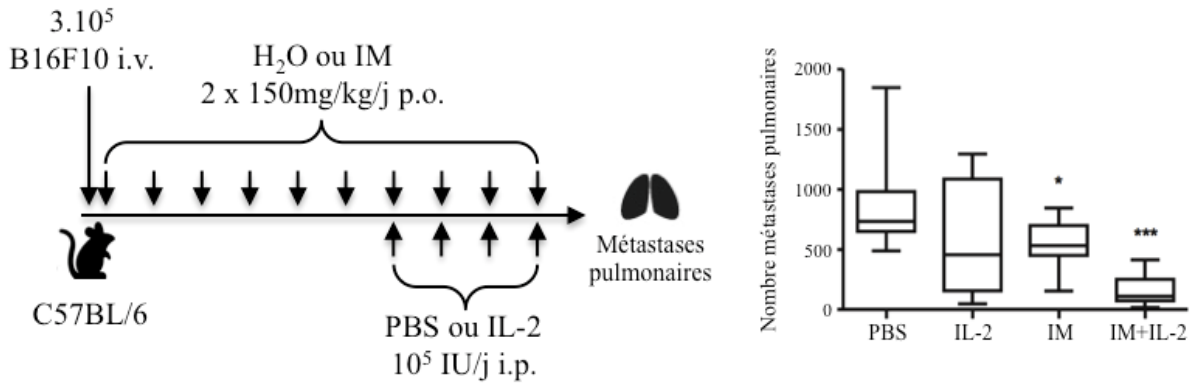


Figure 9 : L'association IM+IL-2 permet de réduire le nombre de métastases pulmonaires chez la souris. 3.10^5 B16F10 (mélanome, syngénique C57BL/6) sont injectées dans la veine de la queue de souris C57BL/6. Les souris sont ensuite traitées 10 jours de suite par 150 mg/kg d'IM administré *per os* (p.o.) 2 fois par jour ou par 200µl d'eau. Les 4 derniers jours, les souris reçoivent en plus 10^5 IU d'IL-2 en intra-péritonéal (i.p.) ou 100µl de PBS. Les souris sont sacrifiées au $11^{ème}$ jour afin de compter le nombre de métastases pulmonaires. L'efficacité de l'IM est meilleure en association avec l'IL-2 [293].

D'un point de vue phénotypique, ces cellules possèdent à la fois des marqueurs pathognomoniques des DC et des NK : elles expriment les marqueurs CD11c/MHC-II, B220, Dx5, NK1.1, NKG2D, Ly49A, L-sélectine, CD122. Leur origine est donc restée largement débattue. Mais récemment, un faisceau d'arguments suggère que ces cellules exprimant le marqueur B220 appartiennent à la lignée des cellules NK [294-297]. Comme les NK, les IKDC dépendent de la voie IL-15 pour leur différenciation [295,296], elles possèdent une activité cytotoxique importante, et produisent de large taux d'IFN-γ après stimulation [292,298]. Contrairement au pDC, les IKDC sont indépendantes de la voie Flt-3 pour leur différenciation, elles n'expriment pas le marqueur PU.1 [295]. Enfin, dans une étude récente, Guimont-Desrochers *et al.* décrivent un sous-type de cellules NK prématures qui pourrait correspondre aux IKDC [297]. Cette étude montre d'une part que les cellules NK matures n'acquièrent pas l'expression de B220 et ce, même en présence de stimuli activateurs. Les cellules $B220^+$ ne semblent donc pas résulter de l'activation de cellules NK [299]. D'autre part, après transfert adoptif, les cellules NK $B220^+$ montrent une capacité de prolifération importante et peuvent se différencier en cellules NK matures. Les cellules

$CD27^+CD11b^{low}CD49b^+CD11c^{int}B220^+$ peuvent être définies comme des cellules NK prématures, précurseurs des cellules NK $CD27^+CD11b^+$ (**Figure 10**).

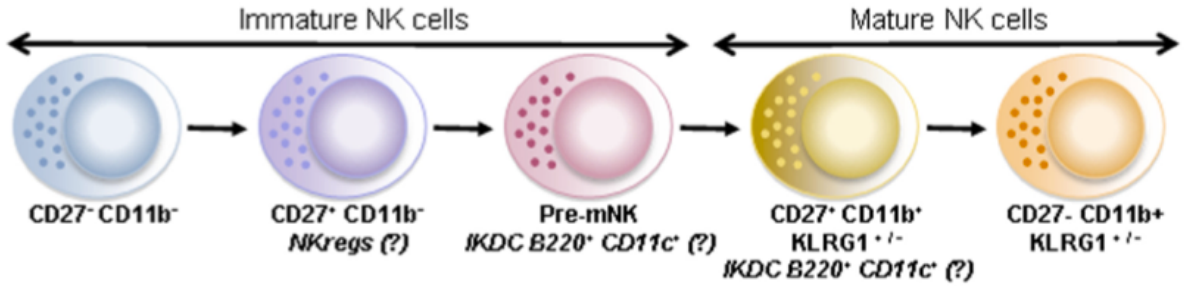


Figure 10 : IKDC : cellules NK prématures ? Une étude récente suggère que les IKDC seraient des précurseurs de cellules NK murines. D'après Desbois *et al.* 2012 [300] (Annexe 3).

Essai clinique de phase I : IMAIL-2

En tenant compte (i) du rôle central des NK dans l'immunosurveillance des tumeurs, (ii) des propriétés de l'IL-2, (iii) de l'implication des NK dans l'efficacité thérapeutique de l'IM et (iv) des résultats précliniques montrant un effet synergique de l'association IM+IL-2, nous avons entrepris un essai clinique associant l'IL-2 à l'IM.

Traitements et posologies à l'étude

Imatinib

Pour les patients atteints de LMC ou de GIST, la posologie recommandée de l'IM est de 400 mg par jour. L'IM ne nécessite pas d'hospitalisation, puisqu'il s'administre par voie orale et que son profil de tolérance est remarquable. Pour cette étude, nous avons donc choisi d'étudier l'effet de l'IL-2 associé à des doses fixes d'IM de 400 mg par jour en une prise.

Interleukine-2

Le récepteur de l'IL-2 peut se présenter sous trois complexes différents d'affinité variable pour l'IL-2. Le récepteur à forte affinité – composé de trois chaines : la chaîne alpha (CD25), la chaîne bêta (CD122) et la chaîne commune gamma (IL-2Rγ) – n'est pas exprimé constitutivement par tous les effecteurs de l'immunité. Seuls les Treg ($CD4^+CD25^+Foxp3^+$) et une sous population de NK ($CD56^{brigh}CD3^-$) l'expriment de manière constitutive et sont donc activés même par de faibles doses d'IL-2 [301,302]. Nous avons choisi de tester dans cet essai clinique quatre doses faibles d'IL-2 : 3, 6, 9 et 12 MUI. En comparaison, la posologie utilisée

dans le traitement du cancer du rein – indication ayant une AMM pour l'IL-2 – est de 18 MUI/m^2.

Cyclophosphamide

Même à faible dose, l'IL-2 peut faire proliférer les Treg qui eux même peuvent inhiber les NK *in vitro* (chez l'homme et la souris) et *in vivo* chez la souris [303]. Afin d'éviter cet effet délétère nous avons mis au point une stratégie permettant d'éliminer et/ou d'inhiber les Treg *in vivo* par un traitement à des doses métronomiques de CTX. Il a en effet été démontré, chez des patients atteints de cancer avancé, que cette dose permettait d'éliminer et/ou d'inhiber sélectivement les Treg et de restaurer des fonctions T et NK [137]. Nous avons par ailleurs démontré, chez la souris, une efficacité supérieure de l'IM en association au CTX du fait de l'inhibition des Treg [293]. Les patients ont donc reçu 50 mg de CTX par jour par voie orale de J-21 à J14.

OBJECTIFS

En combinant l'IM à une immunothérapie non spécifique par la cytokine IL-2, nous souhaitons donc augmenter l'activation des cellules NK de manière à ce qu'elles participent à l'élimination des cellules tumorales. Nous avons également ajouté à cette combinaison du CTX à faible dose qui, en inhibant sélectivement les Treg, devrait renforcer l'activation des cellules NK.

L'association CTX, IM et IL-2 n'ayant jamais été évaluée dans des cancers métastatiques ou localement avancés, il est nécessaire dans un premier temps de s'assurer de l'innocuité de cette association. L'étude IMAIL-2 vise donc à évaluer la tolérance d'une association comportant une chimiothérapie classique, le CTX, une thérapie moléculaire ciblée, l'IM et une immunothérapie avec l'IL-2. Pour cela, l'IL-2 est administrée à doses croissantes afin de déterminer la dose maximale tolérée (DMT) d'IL-2 en association avec des doses constantes d'IM et de CTX. La tolérance au traitement sera principalement évaluée par la nature et la sévérité des effets indésirables.

L'IM est un substrat du cytochrome P450 CYP3A4 et l'IL-2 a été décrit comme pouvant diminuer l'activité des cytochrome P450. L'association de ces différentes molécules est donc susceptible de générer des interactions pharmacocinétiques. Les paramètres pharmacocinétiques standards, incluant le pic de concentration, le temps pour atteindre la concentration maximale, l'aire sous la courbe, la clairance et la demi-vie de l'IM et de l'IL-2 ont donc été déterminés de manière à mettre en évidence une éventuelle modification de l'exposition plasmatique de l'IM ou de l'IL-2.

De manière à étudier l'effet de l'association CTX+IM+IL-2 sur les effecteurs de l'immunité, nous avons réalisé un monitoring immunologique à différents jours du premier cycle de traitement. Les objectifs de ce monitoring immunologique sont d'étudier l'impact de l'association sur le plan phénotypique et fonctionnel des différentes populations immunitaires (LB, LT, Treg, NK), de potentiellement mettre en évidence une sous-population de cellules NK humains pouvant correspondre aux IKDC et de corréler des paramètres immunologiques aux bénéfices cliniques. Ces bénéfices cliniques seront d'ailleurs évalués par le suivi de courbe de survie globale ou de survie sans progression.

En parallèle de cette étude de phase 1, nous avons cherché à mieux caractériser les effets immunomodulateurs de l'IM en étudiant les différents acteurs de l'immunité présents au niveau d'un modèle de tumeur sensible à l'IM : les tumeurs stromales gastro-intestinales.

MATERIEL ET METHODES

Essai clinique de phase 1 : IMAIL-2

Déroulement de l'étude

Le protocole a été approuvé en 2007 par le comité d'éthique de l'Hôpital du Kremlin-Bicêtre (n° 07-019) et par l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (n° A70385-27). Entre novembre 2007 et octobre 2009, 21 patients atteints de tumeurs solides métastatiques ou localement avancées ont été inclus dans l'étude IMAIL-2 visant à évaluer la tolérance d'un traitement associant l'IM et l'IL-2.

Principaux critères d'inclusion

Parmi les principaux critères d'inclusions figurent : un diagnostic de tumeur solide métastatique ou localement avancée (en dehors des tumeurs cérébrales) non curable par les thérapeutiques actuelles, un âge compris entre 18 et 70 ans, une espérance de vie d'au moins 12 semaines, des fonctions hépatiques, rénales, cardiaques et hématologiques satisfaisantes. Les patients doivent également être en mesure d'exprimer un consentement libre, éclairé et écrit.

Principaux critères de non inclusion

Parmi les principaux critères de non inclusion figurent : la présence de métastases cérébrales connues, une infection active, un traitement antérieur par IM ou IL-2 (à noter une exception pour les patients présentant un GIST qui peuvent avoir reçu de l'IM), un traitement en cours par une autre thérapie antitumorale incluant la chimiothérapie, l'immunothérapie, l'hormonothérapie. De plus, les femmes enceintes, susceptibles de l'être ou en cours d'allaitement ainsi que les patients déjà inclus dans un autre essai thérapeutique avec une molécule expérimentale ne sont pas éligibles.

Déroulement du traitement et évaluation des toxicités

Il s'agit d'un essai de phase 1 en escalade de dose, non randomisé et monocentrique. Les patients ont donc tous été suivis à l'institut Gustave Roussy pendant la durée du traitement. L'escalade de dose a été réalisée selon la méthode standard avec au moins 3 patients à chaque palier et un maximum de 6 patients en cas de toxicité limitante (**Figure 11**). Dix patients au total ont été inclus au palier considéré comme la dose recommandée (palier inférieur à la DLT ou dernier palier en absence de DLT).

Les toxicités limitantes (déterminées selon l'échelle des toxicités NCI-CTCAE v3.0) sont définies ainsi : toxicité extra hématologique de grade IV, toxicité extra hématologique de grade III jugée intolérable par le patient ou décès lié au traitement.

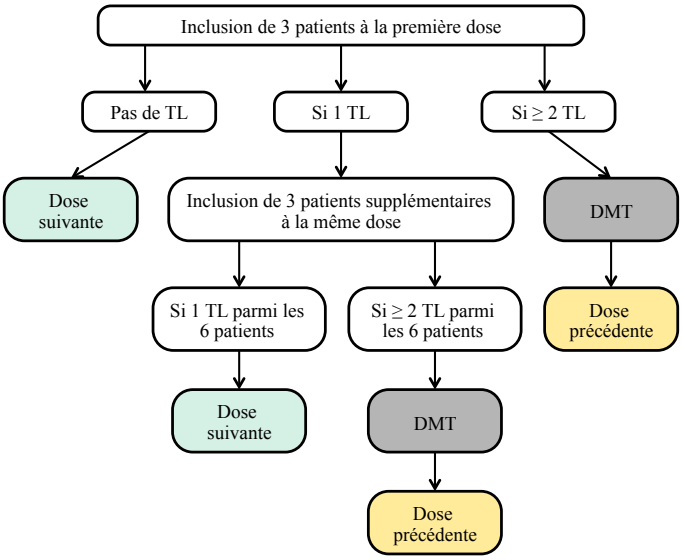


Figure 11 : Schéma d'escalade de dose avec 3 patients par palier de dose.
TL : toxicité limitante ;
DMT : dose maximale tolérée

Les patients reçoivent du CTX entre J-21 et J14, de l'IM entre J1 et J14 ainsi que de l'IL-2 de J10 à J14 (**Figure 12**). Le cyclophasphamide est donné *per os* à des doses métronomiques (50 mg/j en une prise) et n'est plus donné après le premier cycle. L'IM est également donné quotidiennement et *per os* à la dose fixe de 400 mg en une prise, deux semaines sur trois. L'IL-2 est administré 5 jours de suite en injection sous-cutanée ; selon le palier, la dose d'IL-2 administrée est de 3, 6, 9 ou 12 x 10^6 UI/j. En l'absence de toxicité ou de progression de la maladie, les patients seront éligibles pour un autre cycle.

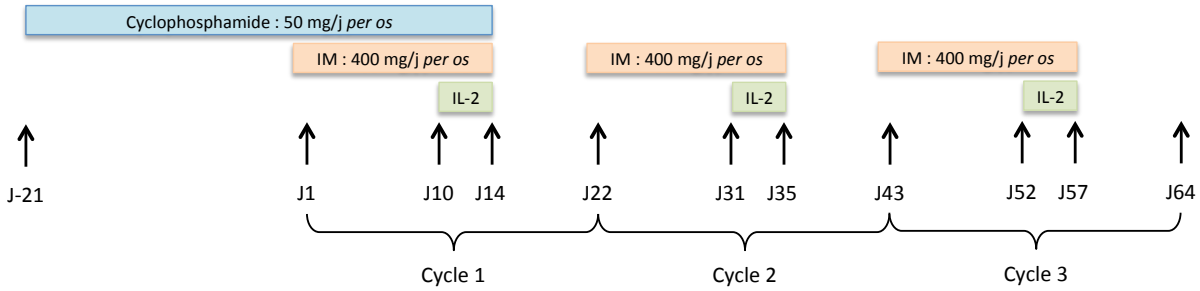


Figure 12 : Schéma thérapeutique de l'essai clinique IMAIL-2. Le CTX est pris par voie orale en une seule prise tous les jours à la dose fixe de 50 mg de J-21 à J14. L'IM est pris par voie orale en une seule prise – tous les jours pendant 2 semaines sur 3 – à la dose fixe de 400 mg. L'IL-2 est injecté par voie sous cutanée de J10 à J14 en une seule injection aux différents paliers de dose. (3, 6, 9 ou 12 x10^6 UI).

Pharmacocinétique

Prélèvements sanguins

Les paramètres pharmacocinétiques de l'IM, de son métabolite principal – le CGP74588 – et de l'IL-2 ont été déterminés au cours du premier cycle. Pour cela, des échantillons de sang ont été collectés avant toute médication puis à 1h, 2h, 5h, 8h, et 24h du J1, J10 et J14. Chaque prélèvement a ensuite été centrifugé à 5000g pendant 10 min de manière à récupérer le plasma qui est conservé à -20°C jusqu'à analyse.

Dosage de l'Imatinib et de CGP74588

Le dosage de l'IM et de son métabolite CGP74588 ont été effectués par chromatographie liquide à détection par spectrométrie de masse avec ionisation en mode électrospray **(**LC-ESI/MS/MS).

Dosage de l'IL-2 et du sCD25

L'IL-2 et son récepteur soluble, le sCD25 sont dosés par ELISA à partir de kits commerciaux standard.

Analyses des paramètres pharmacocinétiques

Les paramètres pharmacocinétiques : aire sous la courbe (AUC), Cmax, Tmax, t1/2 ont été calculés à partir des concentrations sanguines ou plasmatiques par le logiciel WinNonlin®.

Monitoring immunologique

Prélèvements sanguins

Une analyse phénotypique et fonctionnelle des effecteurs de l'immunité (LT, NK, DC et Treg) a été réalisée à partir d'échantillons de sang collectés sur héparine à J-21, J1, J10 et à J14 de chaque cycle. L'analyse phénotypique des cellules immunitaires est effectuée immédiatement après réception du prélèvement sur sang total. L'analyse fonctionnelle est quant à elle réalisée à partir des cellules mononuclées du sang (PBMC : *peripheral blood mononuclear cells*). Ces dernières sont isolées sur gradient de ficoll, puis conservées dans de l'azote liquide jusqu'à analyse.

Analyse phénotypique

L'étude des populations de cellules immunitaires a été réalisée par cytométrie en flux à l'aide d'un FACS-Calibur (BD Biosciences). Plusieurs combinaisons d'anticorps ont été

utilisées pour étudier les différentes populations de LB, LT, Treg, NK et DC (**Tableau 8**). Les Treg sont définis par le phénotype suivant : $CD3^{+}CD4^{+}CD25^{high}CD127^{low}$. Les NK sont caractérisé par le phénotype suivant : $CD3^{-}CD56^{+}$.

Tableau 8 : Combinaison des anticorps utilisés en cytométrie en flux pour le phénotypage des cellules immunitaires.

	Percp	APC	FITC	PE
NK/LB	CD45	CD19	CD3	CD16/56
Lymphocytes T	CD45	CD4	CD3	CD8
	CD3	CD8	CD45RA	CCR7
	CD3	CD4	CD45RA	CCR7
	CD3	CD4	CD8	CCR6
	CD3	CD4	CD8	PD1
	CD3	CD4	CD8	CXCR3
	CD3	CD4	CD8	NKG2D
Treg	CD3	CD4	CD127	CD25
Cellules NK (CD3-CD56+)	CD3	CD56	CD27	HLA-DR
	CD3	CD56	CD27	TRAIL
	CD3	CD56	CD27	CD69
	CD3	CD56	CD27	CX3CR1
	CD3	CD56	CD27	CCR7
	CD3	CD56	CD27	NKp44
	CD3	CD56	CD27	c-kit
	CD3	LAG-3	CD27	CD56
	CD56	LAG-3	CD3	c-kit
DC	CD14/CD19	BDCA3	BDCA2	BDCA1

Analyse fonctionnelle des NK

Les capacités d'activation des cellules NK ont été étudiées *in vitro* par un test de dégranulation du CD107a et d'expression de l'IFN-γ en présence de stimulation exogène par la cible K562 à un ratio effecteurs:cibles de 10:1.

Analyse phénotypique et fonctionnelles des cellules infiltrant les GIST

Patients atteints de GIST

Afin de caractériser l'infiltrat tumoral des GIST, deux études ont été menées en parallèle : l'une rétrospective à partir de blocs paraffinés et l'autre prospective à partir de tumeurs fraichement extraites. L'étude rétrospective a porté sur 92 tumeurs stromales gastro-intestinales dont 68 provenant de GIST localisés et 24 provenant de GIST métastatiques. L'étude prospective a été réalisée à partir de prélèvements sanguins et de tumeurs fraichement extraites de 14 GIST (dont 9 au diagnostic et 5 après traitement par IM) et 6 sarcomes des tissus mous (STS : *soft tissue sarcoma)*.

Immunohistochimie

Les coupes de tissus tumoraux inclus en paraffine ont été marquées par NKp46, CD3, CD8, FoxP3 et CMH-I selon un protocole classique d'immunohistochimie nécessitant une étape de déparaffinage, de réhydratation et de blocage des peroxydases endogènes avant le marquage. Des contrôles négatifs ont été réalisés en substituant l'anticorps primaire par un isotype contrôle. Les cellules positives ont été comptées en double-aveugle à partir de 10 champs lus au grossissement x200.

Analyse phénotypique

Après exérèse chirurgicale, les tumeurs ont été dissociées afin d'obtenir une suspension cellulaire puis marquées par différentes combinaisons d'anticorps. L'étude des populations de cellules immunitaires a été réalisée par cytométrie en flux à l'aide d'un Cyan (Beckmann Coulter).

RESULTATS

Article 1 : Phase I clinical trial combining IM and IL-2 in refractory cancer patients: IL-2 interferes in the pharmacokinetics of IM

Dans cette partie seront présentés les principaux résultats de l'article de Pautier P.*, Locher C.* *et al.* : **Phase I clinical trial combining imatinib mesylate and IL-2 in refractory cancer patients: IL-2 interferes in the pharmacokinetics of IM.**

Entre novembre 2007 et octobre 2009, 21 patients atteints de tumeurs solides métastatiques ou localement avancées ont été inclus dans l'étude IMAIL-2 visant à évaluer la tolérance d'un traitement associant l'IM et l'IL-2. Parmi ces patients, seuls 17 ont été évalués : 2 patients ont en effet progressé avant la prise d'IL-2, un patient n'a pu être évalué pour déviation majeure au protocole et un autre a retiré son consentement avant traitement. Les caractéristiques démographiques des patients sont présentées **Tableau 1**.

Pendant l'étude, il n'a pas été observé de réponse objective (définie selon les critères RECIST). En revanche, une stabilisation de la maladie a été observée chez 47% des patients pour une durée médiane de 84 jours [61-210 jours]. Le taux de survie sans progression déterminé à 6 mois est de 18%, avec une médiane de survie globale de 7.7 mois (**Figures 1A**, **1B**).

Les patients ont été inclus au fur et à mesure avec une escalade de doses. A l'issue de cette phase, la DMT d'IL-2 associée à la dose fixe de 400 mg d'IM, a été déterminée : elle correspond à 6 MUI d'IL-2 administrées par voie sous-cutanée. A ce niveau de dose, tous les patients ont présenté au moins un effet indésirable imputable au traitement : principalement fièvre et frissons, augmentation des enzymes hépatiques, asthénie et nausée mais sans que ne soit observée de toxicité limitante (**Tableau 2**). Les manifestations de toxicité limitante pour la dose supérieure – soit 9 MUI d'IL-2 – sont des toxicités non hématologiques de grade 3, jugées inacceptables : syndrome de fuite capillaire, asthénie et anorexie. Aucun décès consécutif au traitement n'a été observé.

Les profils pharmacocinétiques standards – incluant le pic de concentration, le temps pour atteindre la Cmax, l'AUC, la clairance et la demi-vie – de l'IM et de son principal métabolite actif ont été déterminés à J1, J10 et J14 du premier cycle des patients ayant reçu la dose de 6 MUI d'IL-2 (**Tableaux 3**, **4**). Lors d'administrations répétées en prise quotidienne unique, l'IM ainsi que son métabolite s'accumulent avant d'atteindre un niveau d'équilibre

environ 7 jours après la première prise [165,304]. Dans notre étude, ce phénomène d'accumulation est également observé puisqu'entre J1 et J10, l'$AUC_{(0-24)}$ de l'IM augmente de 29.1 ± 7.4 µg.h/mL à 39.6 ± 13.4 µg.h/mL.

L'administration d'IL-2 à la dose de 6 MUI entraîne une augmentation de l'exposition à l'IM. L'$AUC_{(0-24)}$ et la Cmax de l'IM et du CGP74588 sont en effet significativement augmentées après 5 jours d'IL-2 (**Figures 2A**, **2B**). L'$AUC_{(0-24)}$ de l'IM et du CGP74588 à J14 sont d'ailleurs corrélées à la dose d'IL-2 normalisée en fonction du poids du patient (**Figure 2C**).

La pharmacocinétique de l'IL-2 n'est par contre pas modifiée par l'administration concomitante d'IM. Les paramètres pharmacocinétiques de l'IL-2 sont similaires à ceux observés en monothérapie [305,306]. Le dosage du récepteur soluble de l'IL-2 (sCD25) qui objective l'imprégnation IL-2 est bien augmenté à J14 (**Figure 2D**).

Enfin, si 10 jours d'IM n'impactent pas sur la numération des lymphocytes, des plaquettes et des neutrophiles, l'administration de 5 jours d'IL-2 diminue significativement le nombre de lymphocytes et de plaquettes (**Figure 3**).

RESEARCH PAPER

OncoImmunology 2:2, e23079; February 2013; © 2013 Landes Bioscience

Phase I clinical trial combining imatinib mesylate and IL-2 in refractory cancer patients

IL-2 interferes with the pharmacokinetics of imatinib mesylate

Patricia Pautier,[1,†,*] Clara Locher,[2,3,4,†] Caroline Robert,[1] Alain Deroussent,[5,6] Caroline Flament,[2,3] Axel Le Cesne,[1] Annie Rey,[7] Ratislav Bahleda,[1,8] Vincent Ribrag,[1,8] Jean-Charles Soria,[1,4,8] Gilles Vassal,[1,4] Alexander Eggermont,[1,4] Laurence Zitvogel,[2,3,4] Nathalie Chaput[2,9,†] and Angelo Paci[5,10,†,*]

[1]Département de Médecine; Institut de Cancérologie Gustave Roussy; Villejuif, France; [2]Centre d'Investigation Clinique Biothérapie CICBT 507; Institut de Cancérologie Gustave-Roussy; Villejuif, France; [3]Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale; U1015; Institut de Cancérologie Gustave-Roussy; Villejuif, France; [4]Université Paris-Sud; Kremlin Bicêtre, France; [5]Service de Spectrométrie de Masse Institut de Recherche en Cancérologie Intégré de Villejuif; Institut de Cancérologie Gustave-Roussy; Villejuif, France; [6]Centre National de la Recherche Scientifique; UMR8203; Vectorologie et Thérapeutiques anticancéreuses; Institut de Cancérologie Gustave-Roussy; Villejuif, France; [7]Service de Biostatistique et d'Epidémiologie; Institut de Cancérologie Gustave-Roussy; Villejuif, France; [8]Service Innovations Thérapeutiques Essais Précoces (SITEP); Institut de Cancérologie Gustave-Roussy; Villejuif, France; [9]Unité de Thérapie Cellulaire; Institut de Cancérologie Gustave-Roussy; Villejuif, France; [10]Service Interdépartemental de Pharmacologie et d'Analyse du Médicament (SIPAM); Institut de Cancérologie Gustave-Roussy; Villejuif, France

[†]These authors contributed equally to this work.

Keywords: imatinib mesylate, interleukin-2, pharmacokinetics, maximum tolerate dose, cancer

Abbreviations: AUC, area under the curve; Cmax, maximum concentration; DC, dendritic cell; DLT, dose-limiting toxicity; GIST, gastrointestinal stromal tumors; IL-2, interleukin-2; IM, imatinib mesylate; MTD, maximum tolerated dose; NK, natural killer; OS, overall survival; PDGFR, platelet-derived growth factor receptor; PFS, progression-free survival; *t*1/2, half-life; T_{max}, time to reach the maximum concentration

Imatinib mesylate (IM) is a small molecule inhibitor of protein tyrosine kinases. In addition to its direct effect on malignant cells, it has been suggested IM may activate of natural killer (NK) cells, hence exerting immunomodulatory functions. In preclinical settings, improved antitumor responses have been observed when IM and interleukin-2 (IL-2), a cytokine that enhances NK cells functions, were combined. The goals of this study were to determine the maximum tolerated dose (MTD) of IL-2 combined with IM at a constant dose of 400 mg, the pharmacokinetics of IM and IL-2, as well as toxicity and clinical efficacy of this immunotherapeutic regimen in patients affected by advanced tumors. The treatment consisted in 50 mg/day cyclophosphamide from 21 d before the initiation of IM throughout the first IM cycle (from D-21 to D14), 400 mg/day IM for 14 d (D1 to D14) combined with escalating doses of IL-2 (3, 6, 9 and 12 MIU/day) from days 10 to 14. This treatment was administered at three week intervals to 17 patients. Common side effects of the combination were mild to moderate, including fever, chills, fatigue, nausea and hepatic enzyme elevation. IL-2 dose level II, 6 MIU/day, was determined as the MTD with the following dose-limiting toxicities: systemic capillary leak syndrome, fatigue and anorexia. Pharmacokinetic studies revealed that the area under the curve and the maximum concentration of IM and its main metabolite CGP74588 increased significantly when IM was concomitantly administered with IL-2. In contrast, IM did not modulate IL-2 pharmacokinetics. No objective responses were observed. The best response obtained was stable disease in 8/17 (median duration: 12 weeks). Finally, IL-2 augmented the impregnation of IM and its metabolite. The combination of IM (400 mg/day) and IL-2 (6 MIU/day) in tumors that express IM targets warrants further investigation.

Introduction

Imatinib mesylate (IM) is a 2-phenylaminopyrimidine derivative designed as a specific inhibitor of the inactive conformation of ABL protein tyrosine kinases.[1] Its activity against cells bearing the BCR-ABL translocation has yielded remarkable clinical results in the treatments of chronic myeloid leukemia (CML) with minimal side effects.[2] IM has been found to inhibit other

*Correspondence to: Patricia Pautier and Angelo Paci; Email: patricia.pautier@igr.fr and angelo.paci@igr.fr
Submitted: 10/12/12; Revised: 11/28/12; Accepted: 12/01/12
http://dx.doi.org/10.4161/onci.23079
Citation: Pautier P, Locher C, Robert C, Deroussent A, Flament C, Le Cesne A, et al. Phase I clinical trial combining imatinib mesylate and IL-2 in refractory cancer patients: IL-2 interferes with the pharmacokinetics of imatinib mesylate. OncoImmunology 2013; 2:e23079

tyrosine kinases including platelet-derived growth factor receptor (PDGFR), KIT (CD117), colony stimulating factor 1 receptor (CSF1R) and possibly leukocyte-specific protein tyrosine kinase (LCK).[3-6] The inhibitory activity of IM against KIT and PDGFR has enabled the development of effective treatments for patients affected by gastrointestinal stromal tumors (GIST),[7] eosinophilic disorders and systemic mast cell disease.[8,9]

In addition to its direct effects on malignant cells, IM appears to exert immunomodulatory functions by inhibiting and/or activating specific subsets of immune cells. Our group has demonstrated that IM activates natural killer (NK) cells in GIST patients, resulting in improved progression-free survival (PFS).[10,11] These results indicate that the innate immune response is a major and independent PFS predictive factor in patients with advanced GIST receiving IM.[12] To improve the functions of NK cells in the course of IM treatment, Taieb et al. investigated in preclinical studies a combinatorial regimen involving IM plus interleukin-2 (IL-2), showing that IL-2 is able to increase the antitumor effects of IM.[13-15] These observations provided a robust rationale to launch the Phase I clinical trial *IMAIL-2* at the Gustave-Roussy Institute (Paris), aimed at assessing of the maximum tolerated dose (MTD) of IL-2 administered in combination with daily IM in patients with refractory solid tumors. We also determined the pharmacokinetics of IM when combined with IL-2 and their clinical activity in this cohort of patients.

Results

Patient characteristics. Between October 2007 and October 2009, 21 patients with advanced solid tumors were enrolled in the *IMAIL-2* study at the Gustave-Roussy Institute. Of 21 patients initially enrolled, one was not treated due to a personal choice, two patients did not complete a full cycle of treatment due to disease progression and one patient was not evaluated for dose-limiting toxicity (DLT) due to incorrect medication intake. Seventeen patients hence completed the study, with a median age of 51 y (range 25–74). Patients were affected by the following malignancies: metastatic melanoma (n = 10); ovarian carcinoma (n = 3); Merkel-cell carcinoma (n = 1), GIST (n = 1), rectal adenocarcinoma (n = 1) and cervical adenocarcinoma (n = 1). The characteristics of the 17 patients that completed the study are detailed in **Table 1**.

Clinical efficacy of IM and IL-2 combination therapy. Seventeen patients were evaluated for response, three patients at IL-2 dose level I (3 MIU/day), 11 at IL-2 dose level II (6 MIU/day) and three at IL-2 dose level III (9 MIU/day). The progression-free survival (PFS) rate at six months was 18% (CI 95%: 6–41%) and the median PFS for all 17 patients was two months (**Fig. 1A**). There was no objective tumor response according to RECIST criteria but 8/17 (47%) patients experienced disease stabilization. The median duration of stable disease (SD) was 84 d (range: 61–210 d). The median overall survival (OS) for all patients was

Table 1. Patient characteristics at baseline

Dose level	I	II	III	TOTAL
IM (mg/day)	400	400	400	
IL-2 (MIU/day)	3	6	9	
No. of patients	3	11	3	17
Sex				
Male	0	7	0	7
Female	3	4	3	10
Age (years)				
Median [Range]	58 [30–61]	50 [25–74]	51 [42–57]	51 [25–74]
Height (cm)				
Median [Range]	165 [161–165]	163 [158–188]	168 [163–173]	165 [158–188]
Weight (kg)				
Median [Range]	65 [47–68]	60 [43–86]	59 [47–81]	61 [43–86]
E.C.O.G.				
ND	0	1	1	2
0	2	6	2	10
1	1	4	0	5
Primary tumor site				
Melanoma	0	8	2	10
Ovarian adenocarcinoma	2	0	1	3
Other*	1	3	0	4

*Other tumor sites (one patient each) include Merkel-cell carcinoma, gastrointestinal stromal tumor, rectal adenocarcinoma and cervical adenocarcinoma. IL-2, interleukin-2; IM, imatinib mesylate; MIU, million international unit; ND, not determined.

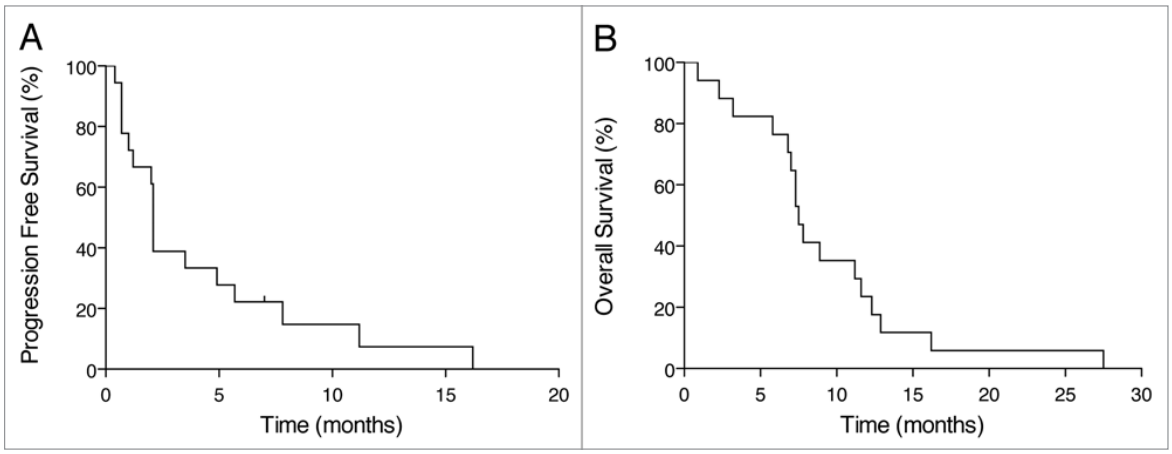


Figure 1. Clinical effects of treatment with imatinib mesylate and interleukin-2. (**A**) Progression-free survival (PFS) from the initiation of treatment with imatinib mesylate (IM) and interleukin-2 (IL-2) of n = 17 patients enrolled in the trial. (**B**) Overall survival (OS) from the initiation of treatment with IM and IL-2 of n = 17 patients enrolled in the trial.

7.7 months (**Fig. 1B**) with a survival rate at six months of 82% (IC 95%: 64–100%). Among 17 patients, nine were treated with three or more cycles (53%). The median PFS and OS of advanced melanoma patients in this trial (10/17) were two and 7.2 mo, respectively. There were no treatment-related deaths; all of them were due to disease.

Safety, tolerability and MTD. Fifty-two courses of IM + IL-2 were administered to 17 patients. All patients experienced at least one treatment-related adverse event (**Table 2**). The most frequent drug-related adverse events were fevers and chills in 16/17 (94%) patients, transaminase elevation in 11/17 (65%) patients, fatigue in 13/17 (76%) patients and nausea in 10/17 (59%) patients. In the three patients on IL-2 dose level I (3 MIU/day) and the first three patients on IL-2 dose level II (6 MIU/day), no dose-limiting toxicities were observed. Two of the three patients on IL-2 dose level III (9 MIU/day) developed a DLT consisting of an unacceptable grade 3 systemic capillary leak syndrome, fatigue and anorexia. The cohort of patients on IL-2 dose level II was then expanded to 11 patients, with no further DLT. Therefore, the MTD was determined to be 6 MIU of IL-2 combined with 400 mg IM. At this dose level, all patients (n = 11) experienced at least one treatment-related adverse event (grade 1 or grade 2 toxicities) but no grade 3 or grade 4 toxicities were observed (**Table 2**). Thus, 400 mg/day IM combined with 6 MIU/day IL-2 appears to be relatively well tolerated.

IM and CGP74588 steady-state accumulation. The pharmacokinetic parameters of IM and its main metabolite CGP74588, as determined by non-compartmental model analyses, were available for patients on IL-2 dose level II. The means and standard deviations for each parameter are given for days D1, D10 and D14 of the first cycle of treatment (**Table 3 and Table 4**).

IM was detectable in the plasma of patients one hour after the first oral administration, and T_{max} was determined to be of two hours. The maximum mean plasma concentration (C_{max}) was 2.2 ± 0.6 μg/mL after once-daily administration while the area under the curve (AUC, 0–24 h) reached 29.1 ± 7.4 μg.h/mL.

The same parameters were evaluated at D10, by which time plasma concentrations had reached the steady-state.[17,18] As anticipated, the AUC (0–24 h) and C_{max} for both IM and its metabolite were significantly higher at D10 than after the first administration (**Fig. 2**). Based on IM levels measured at D1 and D10, the means (± SD) accumulation ratios across different doses (defined as the D10 to D1 trough concentration ratio) were 1.34 ± 0.35 and 1.93 ± 0.69 for IM and CGP74588, respectively.

Effect of IL-2 on IM pharmacokinetics. IL-2 increased the exposure to IM. Indeed, at D14, that is, following five consecutive days of IL-2 co-administration, the AUC (0–24 h) of IM significantly increased from 39.6 ± 13.4 μg.h/mL at D10 to 64.0 ± 16.5 μg.h/mL at D14 (p = 0.002) (**Fig. 2A**). The AUC (0–24 h) at D14 was 61% higher than the AUC (0–24 h) at D10. Along similar lines the C_{max} of IM significantly increased from 3.3 ± 1.6 μg/mL at D10 to 4.9 ± 1.4 μg/mL at D14 (p = 0.028) (**Fig. 2A**). The same modifications were observed for CGP74588 (**Fig. 2B**). Finally, the AUC (0–24 h) of IM and CGP74588 at D14 were positively correlated with the dose of IL-2 upon normalization on the weight of each patient (IL-2/Kg) (**Fig. 2C**). The best correlation was observed for CGP74588 (R = 0.6879, p = 0.0046).

Effect of IM on IL-2 pharmacokinetics. We investigated if IM would influence IL-2 pharmacokinetics. IL-2 pharmacokinetics is well documented: the T_{max} and half-life ($t1/2$) after a subcutaneous injection of IL-2 range from 1.5 to 4.5 and from 3 to 5 h, respectively.[19,20] In patients treated from D10 to D14 with IL-2 together with 400 mg IM, IL-2 C_{max} was reached at 2 h and mean $t1/2$ was 3.1 h. Therefore, the pharmacokinetic parameters of IL-2 in patients co-treated with IM are compatible with those observed in previous pharmacokinetic studies. Altogether, these data indicate that IM does not influence IL-2 pharmacokinetics. Finally, we determined the levels of the soluble form of the α

Table 2. Toxicities according to the National Cancer Institute common toxicity criteria v. 3.0*

Dose level	I		II		III		Total	
No. of patients	3		11		3		17	
No. of courses per patients	3, 3, 3		10, 1, 1, 2, 3, 2, 1, 8, 5, 1, 3		5, 1, 1		52	
Grade	1/2	3/4	1/2	3/4	1/2	3/4	N	%
Gastrointestinal								
Nausea	2	0	5	0	3	0	10	59%
Vomiting	2	0	3	0	0	0	5	29%
Diarrhea	2	0	2	0	3	0	7	41%
Anorexia	2	0	2	0	0	1**	5	29%
Hematologic								
Anemia	0	0	2	0	1	0	3	18%
Leucopenia	0	0	1	1	0	0	2	12%
Lymphopenia	1	0	0	3	0	0	4	24%
Neutropenia	0	0	3	1	0	0	4	24%
Hepatic								
SGOT/AST elevation	3	0	7	0	1	0	11	65%
SGPT/ALT elevation	1	0	7	0	2	0	10	59%
Others								
Skin tissue disorders	1	0	6	0	0	0	7	41%
Systemic capillary leak syndrome	0	0	1	0	0	1**	2	12%
Fatigue	3	0	8	0	1	1**	13	76%
Fever/chills	3	0	10	0	3	0	16	94%
Edema/fluid retention	1	0	6	0	1	0	8	47%
Cough	0	0	3	0	1	0	4	24%
Dyspnea	0	0	2	0	0	0	2	12%

*Data for events with suspected relation to the study drugs that occurred in > 10% of patients; **Dose-limiting toxicity. ALT, alanine transaminase; AST, aspartate transaminase; SGOT, serum glutamic oxaloacetic transaminase; SGPT, serum glutamic pyruvic transaminase.

subunit of the IL-2 receptor (sCD25), which represents a marker of IL-2 impregnation.[21-23] We observed a significant increase of sCD25 at the end of the first treatment cycle in our cohort ($p < 0.001$) (**Fig. 2D**).

Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships. The AUC (0–24 h) of IM and CGP74588 at D1, D10 and D14 were studied in relationship with the absolute count of lymphocytes, neutrophils and platelets. As shown in **Figure 3**, while the AUC (0–24 h) of IM increased between D1 and D10, no significant modifications of lymphocyte, neutrophil or platelet counts could be documented. Lymphocyte and platelet counts were significantly reduced in response to the combination therapy at D14 (**Fig. 3A and B**). Of note, neutrophil, monocyte and eosinophil counts were affected neither by IM alone nor by the combinatorial regimen (**Fig. 3C** and data not shown). Among patients on IL-2 dose level III that experienced limiting toxicities (patient #10, exhibiting a grade 3 systemic capillary leak syndrome and patient #11, exhibiting grade 3 asthenia and anorexia), only patient #10 was monitored for the pharmacokinetics of IM and IL-2. This patient had the highest AUC (0–24 h) for IM and CGP74588 (106.5 and 25.1 μg.h/mL, respectively). Patient #8, also on IL-2 dose level III but experiencing no toxicity, exhibited AUC (0–24 h) values of IM and CGP74588 (43.3 and 13.4 μg.h/mL, respectively) that were comparable to patients on IL-2 dose level II.

Discussion

We investigated the safety of IM combined with increasing doses of IL-2 in patients affected by refractory advanced solid tumors. To our knowledge, this is the first report on the combination of IM with IL-2 in late stage cancer patients. In the present study, the MTD of IL-2 in combination with 400 mg/day IM was estimated at 6 MIU/day.

This study shows that the co-administration of IL-2 increases the systemic exposure of patients to IM and its main metabolite, CGP74588. The C_{max} and AUC of IM and CGP74588 were indeed significantly increased by 49 and 61%, respectively. This could be explained by a interaction between the two drugs. IL-2 is known for its ability to limit the enzymatic activity of cytochrome P450 and monooxygenase,[24] especially at doses > 6 MIU for the former > 9 MIU for the latter. Since in our study the pharmacokinetics of CGP74588 and that of IM were altered by IM in the same manner, these effects cannot stem from the IL-2 mediated inhibition of cytochrome P450 and monooxygenase activity. In addition, IL-2 is able to affect plasma membrane transporters,

Table 3. Pharmacokinetic parameters of IM

		T_{max} (h)		C_{max} (μg/mL)		*t*1/2 (h)		AUC (0–24) (μg.h/mL)		AUC (0-inf) (μg.h/mL)		Vd (L)		Cl (L/h)	
	No. of patients	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Day 1	9	2.0	1.2	2.2	0.6	10.1	1.6	29.1	7.4	39.7	17.8	164.3	53.8	11.2	3.2
Day 10	10	2.1	1.1	3.3	1.6	13.1	8.9	39.6	13.4	64.1	28.2	126.5	64.2	7.8	4.9
Day 14	10	2.5	1.4	4.9	1.4	13.0	3.9	64.0	16.5	94.6	30.6	82.9	24.5	4.7	1.7

AUC, area under the curve; Cl, total body clearance; *t*1/2, half-life; T_{max}, time to reach the maximum concentration; Vd, volume of distribution at steady-state.

Table 4. Pharmacokinetic parameters of CGP74588

		T_{max} (h)		C_{max} (ng/ml)		*t*1/2 (h)		AUC (0–24) (μg.h/mL)		AUC (0-inf) (μg.h/mL)		Vd (L)		Cl (L/h)	
	No. of Patients	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Day 1	9	2.3	1.6	294.0	47.5	14.4	2.8	4.1	1.0	6.7	2.7	1364.5	383.6	66.6	20.9
Day 10	10	2.2	1.6	520.8	215.8	36.2	32.5	7.7	2.7	23.8	16.0	827.8	471.2	22.8	11.6
Day 14	10	3.8	2.3	727.0	200.2	32.5	20.1	13.2	3.8	37.0	28.2	531.5	170.2	14.9	7.4

AUC, area under the curve; Cl, total body clearance; *t*1/2, half-life; T_{max}, time to reach the maximum concentration; Vd, volume of distribution at steady-state.

hence leading to increased efflux of some drugs, as demonstrated in peripheral blood mononuclear cells.[25] These pharmacokinetic modifications may partly be explained by decreased P-glycoprotein expression, as described in mice by Hosten et al.[26] This hypothesis is currently under investigation in vitro, to better understand the impact IL-2 on the expression and functionality of P-glycoprotein and breast cancer resistance protein (BCRP) in human lymphocytes, as well as how this may influence the transport of IM.

Regarding the pharmacodynamic aspects of the interaction between IL-2 and IM, the significant decrease in lymphocytes and platelets observed between D10 and D14 of treatment could be ascribed to the adjunction of IL-2, since no decrease was detectable between D1 and D10 (when IM was administered alone). The impact of IL-2 on lymphocyte counts has previously been described by others[27] and has hypothetically been ascribed to an effect of lymphocyte redistribution[28] and/or to activation-induced cell death.[29,30] At high doses (up to 0.3 MIU/kg i.v. every eight hours over 3–4 d), IL-2 infusions have previously been shown to result in moderate to severe thrombocytopenia.[27] With 6 MIU IL-2, we observed a significant drop in platelet counts, but this decrease never reached levels associated with an increased hemorrhagic risk. In addition, we never observed a greater reduction in subsequent cycles compared with cycle 1 (not shown). The analysis of sCD25 levels, IL-2 *t*1/2 and AUC did not reveal any modifications of the pharmacokinetics of IL-2 when given in combination with IM.

As previously shown, IM may act as an immunomodulatory agent, in particular as it promotes the dendritic cell (DC)-NK cell crosstalk, leading to increased secretion of tumor necrosis factor α (TNFα) and interferon γ (IFNγ) by NK cells and IL-12 by DCs.[30,32] This immunomodulatory activity of IM was found to constitute an independent prognostic factor and was associated with longer PFS in GIST patients.[31-33] Moreover, a preclinical study has shown that IM may synergize with IL-2 at reducing lung metastases after an i.v. injection of B16F10 melanoma cells, which are not sensitive to the direct cytotoxic effects of IM.[34] Such a synergistic antitumor effect was mainly due to an increased cytotoxicity of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-dependent HLA-DR$^+$CD11c$^+$B220$^+$NK1.1$^+$ cells, the so-called interferon-producing killer DCs (IKDCs).[34] Thus, IL-2 has been envisaged to boost IM-elicited antitumor immunity in cancer patients, in particular by inducing IKDCs in vivo. A comprehensive immunomonitoring of this patient cohort was undertaken (see companion paper in *OncoImmunology*, 2:e23080).

In our cohort, 8/17 patients (47%) experienced disease stabilization after a median treatment duration of 12 weeks. Unfortunately, we were only able to include one patient affected by GIST in this study, and, among the other patients, ten were affected by metastatic melanoma. It would be interesting to evaluate this combinatorial regimen in tumors bearing *KIT* mutations and see whether the adjunction of IL-2 can boost the efficacy of IM. Many teams have tried to combine IM with other immunotherapeutic agents in order to enhance its clinical efficacy against solid tumors, and many of them have investigated the combination of IM with conventional chemotherapy. However, only modest signs of clinical benefits were documented, often in association with a relatively poor tolerance. In one study, IM was combined with IFNα in patients affected by metastatic renal cell carcinoma (RCC). The response rate was 6% with a median time to progression of two months, de facto constituting no improvement as compared with the administration of IFNα alone.[35] As significant toxicities were observed, the investigators concluded that further studies of IM combined with IFNα would not be recommended in patients with metastatic RCC.[36] The clinical efficacy of this combinatorial regimen in GIST patients, which

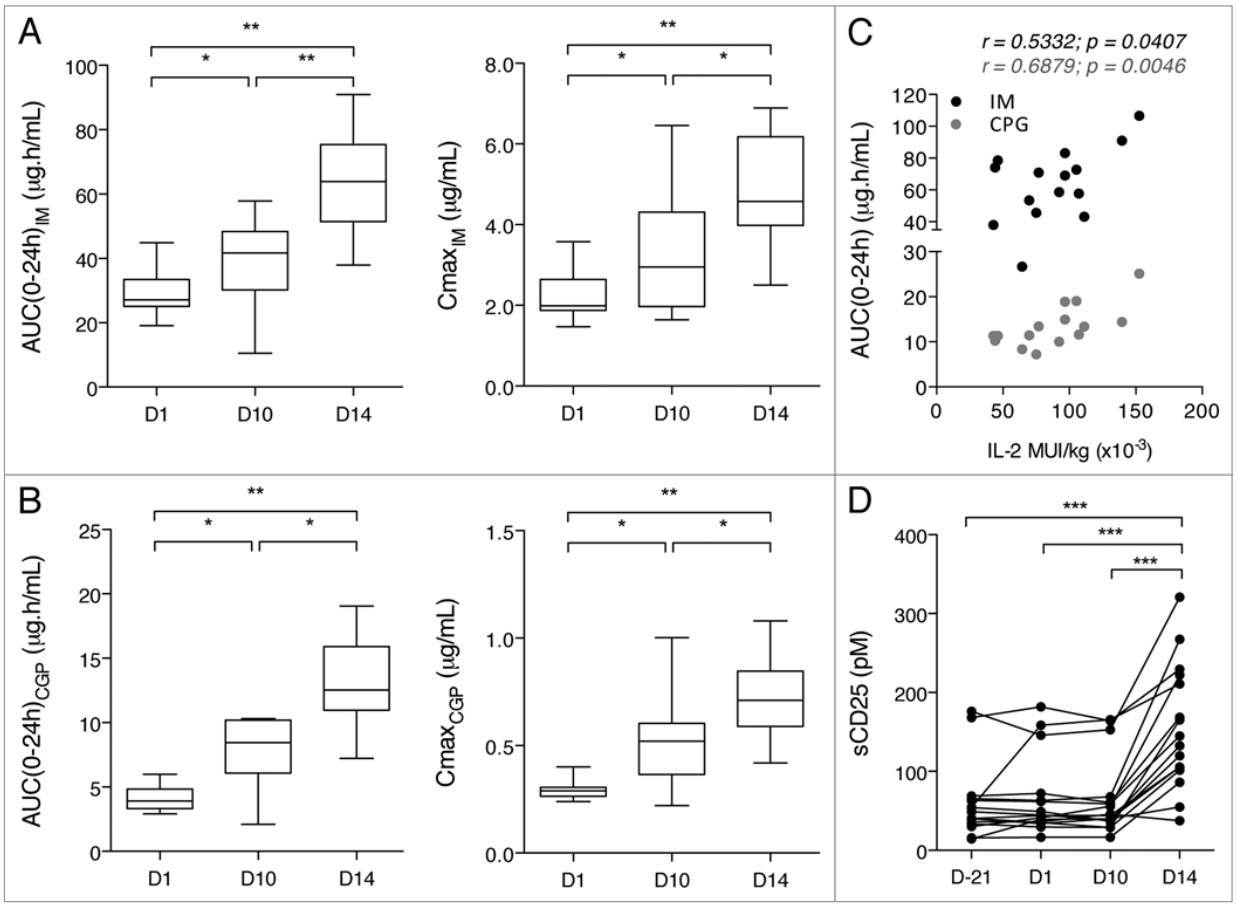


Figure 2. Interleukin-2 impacts on imatinib mesylate pharmacokinetic. (**A and B**) Area under the curve (AUC, left panel) and C_{max} (right panel) of imatinib mesylate (IM, (**A**) and CGP74588 CGP, (**B**) immediately after the initiation of the treatment (D1), after 10 d of treatment with IM alone (D10) and after 14 d of treatment with IM plus interleukin-2 (IL-2) at dose level II (6 MIU/day) on the last 4 d (D14). Wilcoxon signed rank test was used and results from statistical analyses are depicted on each graph. (**C**) Correlation between IL-2 MIU/kg body weight and AUC (0–24h) of IM (dark circles) or CGP74588 (gray circles) (**D**) Dynamic pattern of the soluble form of CD25 (sCD25).

has a comparatively stronger rationale because IM specifically targets GIST-associated KIT or PDGFR mutants,[37] appears to be far superior to that observed in individuals affected by RCC.

Approximately 71% of GIST patients exhibit mutations in exon 11 of *KIT*, followed by mutations in *KIT* exon 9 (8.2%), *KIT* exon 13 (1.2%), *PDGFRA* exon 18 (1.2%) and *KIT* exon 17 (1.0%). These mutations are important as they often dictate the patient sensitivity to IM therapy. In particular, *KIT* exon 11 mutations are associated with comparatively longer time to progression (median 27.2 mo) and OS (median 60 mo).[37] IM and IFNα have recently been combined in patients bearing stage III/IV GIST in a study designed to promote IM antitumor immunity with IFNα.[38] IM is thought to undermine tumor-induced immune tolerance[39] and, owing to its cytotoxic activity, may promote the shedding of tumor-associated antigens for DC uptake, presentation and priming of T_H1 responses.[38] In 8 patients evaluated in this respect, the combination of IM and IFNα was associated with increased T_H1 and NK cell activity. Clinical responses were encouraging, since an objective response rate of 100% (including both complete and partial responses) and an OS of 100% with a median follow-up of 3.6 y were observed. These clinical findings appear superior than those obtained with IM monotherapy, yet, so far, remain preliminary.[38]

Our study did not demonstrate any major therapeutic effects stemming from the combination of IM and IL-2. However, we confirmed that IM can be associated with 6 MIU IL-2 with an acceptable tolerance profile. Improving IM exposure may bring about clinical benefits, as suggested by pharmacokinetic studies in individuals affected by CML and GIST. Among CML patients, a significant correlation has been detected between IM trough plasma levels and cytogenetic and molecular responses.[40-42] In GIST patients, a relationship between IM pharmacokinetics and clinical responses is emerging.[43] Finally, as shown in the companion paper (*OncoImmunology* 2:e23080), the combination of IM and IL-2 was able to induce the accumulation of HLA-DR^+ NK cells, which are linked to clinical outcome. As IM has been shown to decrease intratumoral regulatory T cells (Tregs) in an indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)-dependant manner by

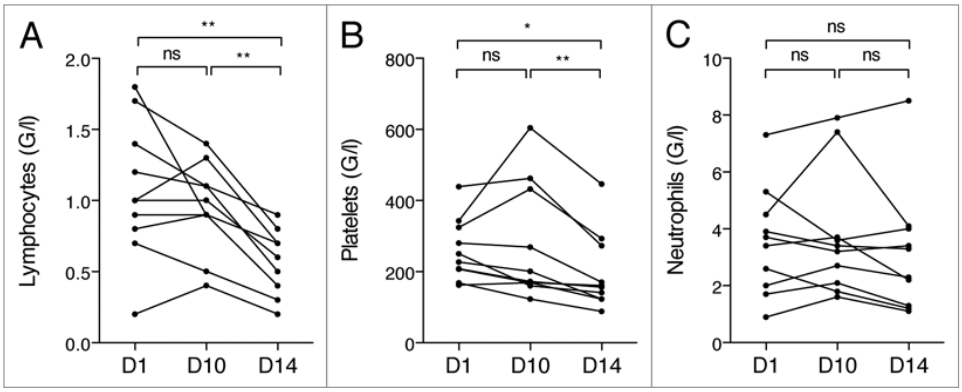


Figure 3. Impact of imatinib mesylate alone or combined with interleukin-2 on the hematopoietic compartment. (**A–C**) Lymphocyte (**A**), platelet (**B**) and neutrophil (**C**) counts at day one after starting treatment (D1), immediately after the initiation of the treatment (D1), after 10 d of treatment with imatinib mesylate (IM) alone (D10) and after 14 d of treatment with IM plus interleukin-2 (IL-2) at dose level II (6 MIU/day) on the last 4 d (D14). Wilcoxon signed rank test was used and results from statistical analyses are depicted on the graph.

inhibiting oncogenic KIT signaling,[39] and as Tregs are capable of inhibiting NK cell functions,[44,45] further studies on the synergistic clinical activity of IL-2 and IM should involve patients affected by tumors bearing *KIT* mutations such as GIST.

Patients and Methods

Patient eligibility. Adult patients with metastatic or locally advanced solid malignancy, measurable or evaluable disease who were refractory to standard therapy were eligible for the study (Phase I *IMAIL-2* trial approved by the Kremlin Bicêtre Hospital Ethics Committee [no 07–019] and the Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé [no A70385–27; EudraCT N°:2007–001699–35 in 2007]. Further requirements included: chronological age > 18 y and physiological age < 70 y; more than four weeks since the last disease-specific treatment, adequate bone marrow function defined as an absolute white blood count ≥ 4 × 10^9/L, neutrophil count ≥ 1.5 × 10^9/L, platelets ≥ 100 × 10^9/L and hemoglobin ≥ 9 g/dL; SGOT, SGPT and alkaline phosphatases ≤ 2-fold the upper limit of normal (ULN) (≤ 3 ULN in case of liver metastases); bilirubin < 1.25 ULN; creatinine < 1.25 ULN, creatinine clearance ≥ 60 mL/min; good cardiac function (left ventricular ejection fraction > 50%), an Eastern Cooperative Oncology Groups (ECOG) performance status ≤ 2; no concurrent uncontrolled medical illness; no active viral hepatitis or HIV infection; no other current or previous malignancy in the past five years (except for adequately treated cone-biopsied in situ carcinoma of the cervix and basal or squamous cell carcinoma of the skin); a life expectancy of 12 or more weeks and a signed informed consent. Patients recruited had not received IM and IL-2 previously, except for GIST patients who could have received IM. No concomitant antitumor treatment was allowed. Patients with active brain metastases, severe concomitant cardiac disease (cardiac insufficiency, myocardial infarction during the previous six months, severe/unstable angina or stroke, non-controlled arterial hypertension), peripheral neuropathy ≥ grade 2 and pregnant or breast-feeding women were not eligible.

Dose escalation and toxicity assessment and clinical efficacy. The study was conducted as a single-center, Phase I, dose-escalation trial. A minimum of three patients were monitored for at least one complete cycle before dose escalation. If none of the first three patients in any cohort experienced a DLT, the next three patients were enrolled at the next higher dose level. If one instance of DLT was observed, three additional patients were treated at that dose level. When one of these additional patients had a DLT, the dose level of the previous cohort was considered as the MTD. No intra-patient dose escalation was allowed. Safety was evaluated at day one (D1), D10 and D14. Toxicities were graded according to the National Cancer Institute Common Toxicity Criteria (NCI-CTC) version 3.0. DLT was defined as any unacceptable grade three or greater non-hematologic toxicity, grade 4 hematologic toxicity or treatment-related death. Response to therapy was assessed using the Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST),[16] with scans evaluation at baseline, after one cycle of treatment (between D14 and D21) and every two cycles (every six weeks) until progression of the disease.

Treatment schedule. A low dose (50 mg/day) of the alkylating agent cyclophosphamide (CTX) was given orally from D-21 until D14, exclusively during the first cycle. IM (Gleevec®) was administered orally once daily at 400 mg from D1 to D14. IL-2 was administered subcutaneously from D10 to D14. Cycle 2 was started at day 21 (day 1 = day 21). Four dose levels of IL-2 (Proleukine®) were explored according to toxicity: 3 million international units (MIU) per day (level I), 6 MIU/day (level II), 9 MIU/day (level III) and 12 MIU/day (level IV). In case of DLT at the first level, a level 0 with 1 MIU/day had to be evaluated. If two patients presented a DLT at level 0, the association would be considered too toxic to be explored in a Phase II trial. IM and IL-2 cycles were repeated every 3 weeks until patients experienced disease progression or DLT. A dose reduction of no more than two dose levels of IL-2 was permitted after the first cycle and decided by the investigators. No dose escalation was permitted. A reduction of the IM dose was permitted in case of specific toxicity. Treatment could be stopped prematurely in case

of inacceptable toxicity, disease progression or patient refusal to continue the study. Data from patients who withdrew prematurely from the study were not included in the final analyses.

Chemicals. IM, [d8]-imatinib and *N*-desmethyl-imatinib (CGP74588) were kindly provided by Novartis, with purities of 99.6, 97.0 and 99.7%, respectively. Stock solutions of each compound were prepared at 1 mg/mL in methanol and stored at -20°C.

Blood sampling. In order to determine IM and CGP74588 concentrations, venous blood samples were collected during cycle 1 on D1, D10 and D14 at 0, 1, 2, 5, 8 and 24 h after drug administration. For each plasma sample, blood was collected in a tube containing heparin, inverted several times, centrifuged at 5,000 × g for 10 min and stored at -20°C.

Quantification of IM and CGP74588 by LC-MS/MS. Plasma samples (0.25 mL) were mixed with 50 μL of internal standard [d8]-imatinib (500 ng/mL in methanol), deproteinized with 200 μL of cold acetonitrile and centrifuged at 4,000 × g for 10 min at 4°C. The resulting supernatant was drawn into a glass vial and stored at 4°C until LC-MS/MS analysis. IM and CGP74588 were quantified in plasma samples by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC-ESI/MS/MS) using the Quattro-Ultima LCZ® triple-quadrupole mass spectrometer (Waters, Micromass) coupled with the 1100 series HPLC system (Agilent Technologies) and fitted with a Uptiphere® C18 column (5 μm, 100 mm × 2 mm i.d.) supplied by Interchim. The isocratic mobile phase composed of methanol/ammonium acetate 6 mM (72/28, v:v) was run at a flow-rate of 0.25 mL/min.

IM and CGP74588 were detected with the mass spectrometer operating in positive electrospray ionisation mode, using a capillary voltage, a cone voltage and a collision energy set at 3.5 kV, 40 V and 25 eV, respectively. IM, CGP74588 and the [d8]-imatinib internal standard were detected by multiple reaction monitoring (MRM) using the transitions 494→394, 480→394 and 502→394, respectively. The concentrations of both compounds were quantified using Masslynx® and Quanlynx® software with a weighted ($1/x^2$) least-square linear calibration over the range set from 10 to 10,000 ng/mL. Nine plasma standards (10, 20, 50, 100, 200, 1000, 2000, 5000 and 10000 ng/mL) were prepared in duplicate each day. Quality control plasma samples (10, 200, 2000 and 4000 ng/mL) were prepared over three days. Within-run and between-run accuracies and precision were evaluated to be lower than 15% according to FDA and ICH recommendations. The lower limit of quantification for both compounds was 10 ng/mL. The retention time of IM and CGP74588 were found at 2.1 and 2.6 min, respectively.

Pharmacokinetic analysis. Pharmacokinetic parameters were calculated from plasma IM and CGP74588 concentration-time using non-compartmental methods of WinNonlin, version 3.2 (Pharsight). The mean maximal plasma concentration of IM and CGP74588 (C_{max}) and the time to reach C_{max} (T_{max}) were recorded from the individual subject concentration-time curve. The terminal phase elimination rate constant (*Ke*) was determined from the slope of the terminal portion of the log-concentration vs. time curve by linear least-squares regression analysis of the plasma concentration-time profile. The terminal phase elimination half-life ($t1/2$) was calculated as $\ln 2/Ke$. The area under the plasma concentration-time curve from time 0 to the last measurable concentration at time t [AUC (0-t)] was calculated using the linear trapezoidal method. For IM and CGP74588, the AUC (0-inf) was computed as AUC (0-t) plus the extrapolation from the last time point to infinity using Ct/*Ke*, where Ct is the last quantifiable concentration. The extrapolated AUC before the first time point and after the last time point did not exceed 20% of the total AUC (0–inf). For IM, total body clearance (Cl) was calculated from the dose/AUC (0–inf). The volume of distribution (Vd) at steady-state was calculated as Dose/Cl. Plasma concentrations below the assay lower limit of detection were treated as 0.0 ng/mL in order to calculate pharmacokinetic parameters. Actual times after the start of infusion were used in the calculation of pharmacokinetic parameters.

Serum concentration of the soluble form of sCD25 and IL-2. sCD25 levels of serum were determined in accordance with the manufacturer's procedure using the Soluble IL-2 Receptor EIA Kit obtained from IMMUNOTECH (IM10559; Beckman Coulter, Inc.). Patient's sera were collected at cycle 1 before treatment (D21) after metronomic cyclophosphamide (D1) and after IM treatment (D10) and at the end of IM+IL-2 treatment (D14). Serum IL-2 concentration was measured with the EIA Kit obtained from BD Bioscience (BD OptEIA). As in the pharmacokinetic study of IM, serum IL-2 concentrations were determined at D14 at 0, 1, 2, 5, 8 and 24 h after IL-2 administration.

Statistical analyses. For the efficacy analysis, the response rate was estimated on patients who had already received one cycle of treatment and for whom response had been evaluated. Descriptive data were used to summarize the characteristics of patients, the administration of and compliance to treatment, tolerance and efficacy and pharmacokinetics parameters. No interim analysis was planned. Descriptive data were compared, using the χ^2 test or Fisher's exact test for proportions and the Student's t-test or the Wilcoxon rank-sum test for continuous measures. Correlation analyses were performed between two parameters using the Pearson's test. OS and PFS were estimated according to the Kaplan-Meier method. OS was defined as the time from the diagnosis to death from any cause or to the last follow-up if no death had occurred. PFS was defined as the time from the diagnosis to progression or to the last follow-up if no progression has occurred. Patients who had not experienced an event at the time of the analysis were censored at the date of the last follow up.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

This work was supported by Novartis SA, Institut National du Cancer (INCa), la Ligue contre le cancer (LIGUE labelisée, L.Z.), l'Association pour la Recherche sur le Cancer (A.R.C.), Fondation pour la Recherche Médicale and Fondation de France. We acknowledge Novartis for providing chemicals used for pharmacokinetic analyses, i.e., [d8]-imatinib and *N*-desmethyl-imatinib (CGP74588). The authors thank Lorna Saint Ange (Institut Gustave Roussy) for editing.

References

1. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, et al. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. Nat Med 1996; 2:561-6; PMID:8616716; http://dx.doi.org/10.1038/nm0596-561.
2. Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, Gathmann I, Kantarjian H, Gattermann N, et al.; IRIS Investigators. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. N Engl J Med 2006; 355:2408-17; PMID:17151364; http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa062867.
3. Buchdunger E, Cioffi CL, Law N, Stover D, Ohno-Jones S, Druker BJ, et al. Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors. J Pharmacol Exp Ther 2000; 295:139-45; PMID:10991971.
4. Dewar AL, Doherty KV, Hughes TP, Lyons AB. Imatinib inhibits the functional capacity of cultured human monocytes. Immunol Cell Biol 2005; 83:48-56; PMID:15661041; http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1711.2004.01296.x.
5. Fabian MA, Biggs WH 3rd, Treiber DK, Atteridge CE, Azimioara MD, Benedetti MG, et al. A small molecule-kinase interaction map for clinical kinase inhibitors. Nat Biotechnol 2005; 23:329-36; PMID:15711537; http://dx.doi.org/10.1038/nbt1068.
6. Guo J, Marcotte PA, McCall JO, Dai Y, Pease LJ, Michaelides MR, et al. Inhibition of phosphorylation of the colony-stimulating factor-1 receptor (c-Fms) tyrosine kinase in transfected cells by ABT-869 and other tyrosine kinase inhibitors. Mol Cancer Ther 2006; 5:1007-13; PMID:16648572; http://dx.doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-05-0359.
7. Joensuu H, Roberts PJ, Sarlomo-Rikala M, Andersson LC, Tervahartiala P, Tuveson D, et al. Effect of the tyrosine kinase inhibitor STI571 in a patient with a metastatic gastrointestinal stromal tumor. N Engl J Med 2001; 344:1052-6; PMID:11287975; http://dx.doi.org/10.1056/NEJM200104053441404.
8. Pardanani A, Ketterling RP, Brockman SR, Flynn HC, Paternoster SF, Shearer BM, et al. CHIC2 deletion, a surrogate for FIP1L1-PDGFRA fusion, occurs in systemic mastocytosis associated with eosinophilia and predicts response to imatinib mesylate therapy. Blood 2003; 102:3093-6; PMID:12842979; http://dx.doi.org/10.1182/blood-2003-05-1627.
9. Pardanani A, Reeder T, Li C-Y, Tefferi A. Eosinophils are derived from the neoplastic clone in patients with systemic mastocytosis and eosinophilia. Leuk Res 2003; 27:883-5; PMID:12860006; http://dx.doi.org/10.1016/S0145-2126(03)00065-1.
10. Borg C, Terme M, Taïeb J, Ménard C, Flament C, Robert C, et al. Novel mode of action of c-kit tyrosine kinase inhibitors leading to NK cell-dependent antitumor effects. J Clin Invest 2004; 114:379-88; PMID:15286804.
11. Delahaye NF, Rusakiewicz S, Martins I, Ménard C, Roux S, Lyonnet L, et al. Alternatively spliced NKp30 isoforms affect the prognosis of gastrointestinal stromal tumors. Nat Med 2011; 17:700-7; PMID:21552268; http://dx.doi.org/10.1038/nm.2366.
12. Ménard C, Blay J-Y, Borg C, Michiels S, Ghiringhelli F, Robert C, et al. Natural killer cell IFN-gamma levels predict long-term survival with imatinib mesylate therapy in gastrointestinal stromal tumor-bearing patients. Cancer Res 2009; 69:3563-9; PMID:19351841; http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-3807.
13. Mignot G, Ullrich E, Bonmort M, Ménard C, Apetoh L, Taieb J, et al. The critical role of IL-15 in the anti-tumor effects mediated by the combination therapy imatinib and IL-2. J Immunol 2008; 180:6477-83; PMID:18453565.
14. Taieb J, Chaput N, Ménard C, Apetoh L, Ullrich E, Bonmort M, et al. A novel dendritic cell subset involved in tumor immunosurveillance. Nat Med 2006; 12:214-9; PMID:16444265; http://dx.doi.org/10.1038/nm1356.
15. Ullrich E, Bonmort M, Mignot G, Jacobs B, Bosisio D, Sozzani S, et al. Trans-presentation of IL-15 dictates IFN-producing killer dendritic cells effector functions. J Immunol 2008; 180:7887-97; PMID:18523252.
16. Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, Wanders J, Kaplan RS, Rubinstein L, et al. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. J Natl Cancer Inst 2000; 92:205-16; PMID:10655437; http://dx.doi.org/10.1093/jnci/92.3.205.
17. O'Brien SG, Meinhardt P, Bond E, Beck J, Peng B, Dutreix C, et al. Effects of imatinib mesylate (STI571, Glivec) on the pharmacokinetics of simvastatin, a cytochrome p450 3A4 substrate, in patients with chronic myeloid leukaemia. Br J Cancer 2003; 89:1855-9; PMID:14612892; http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjc.6601152.
18. Pollack IF, Jakacki RI, Blaney SM, Hancock ML, Kieran MW, Phillips P, et al. Phase I trial of imatinib in children with newly diagnosed brainstem and recurrent malignant gliomas: a Pediatric Brain Tumor Consortium report. Neuro Oncol 2007; 9:145-60; PMID:17293590; http://dx.doi.org/10.1215/15228517-2006-031.
19. Gustavson LE, Nadeau RW, Oldfield NF. Pharmacokinetics of teceleukin (recombinant human interleukin-2) after intravenous or subcutaneous administration to patients with cancer. J Biol Response Mod 1989; 8:440-9; PMID:2787839.
20. Kirchner GI, Franzke A, Buer J, Beil W, Probst-Kepper M, Wittke F, et al. Pharmacokinetics of recombinant human interleukin-2 in advanced renal cell carcinoma patients following subcutaneous application. Br J Clin Pharmacol 1998; 46:5-10; PMID:9690943; http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2125.1998.00036.x.
21. Obeid M, Tesnière A, Ghiringhelli F, Fimia GM, Apetoh L, Perfettini J-L, et al. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. Nat Med 2007; 13:54-61; PMID:17187072; http://dx.doi.org/10.1038/nm1523.
22. Lotze MT, Custer MC, Sharrow SO, Rubin LA, Nelson DL, Rosenberg SA. In vivo administration of purified human interleukin-2 to patients with cancer: development of interleukin-2 receptor positive cells and circulating soluble interleukin-2 receptors following interleukin-2 administration. Cancer Res 1987; 47:2188-95; PMID:3030546.
23. Carson WE, Haldar S, Baiocchi RA, Croce CM, Caligiuri MA. The c-kit ligand suppresses apoptosis of human natural killer cells through the upregulation of bcl-2. Proc Natl Acad Sci U S A 1994; 91:7553-7; PMID:7519782; http://dx.doi.org/10.1073/pnas.91.16.7553.
24. Sunman JA, Hawke RL, LeCluyse EL, Kashuba ADM. Kupffer cell-mediated IL-2 suppression of CYP3A activity in human hepatocytes. Drug Metab Dispos 2004; 32:359-63; PMID:14977871; http://dx.doi.org/10.1124/dmd.32.3.359.
25. Liptrott NJ, Penny M, Bray PG, Sathish J, Khoo SH, Back DJ, et al. The impact of cytokines on the expression of drug transporters, cytochrome P450 enzymes and chemokine receptors in human PBMC. Br J Pharmacol 2009; 156:497-508; PMID:19154420; http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.2008.00050.x.
26. Hosten B, Abbara C, Cibert M, Petit B, Farinotti R, Gonin P, et al. Interleukin-2 treatment effect on imatinib pharmacokinetic, P-gp and BCRP expression in mice. Anticancer Drugs 2010; 21:193-201; PMID:20016370; http://dx.doi.org/10.1097/CAD.0b013e3283349913.
27. Ettinghausen SE, Moore JG, White DE, Platanias L, Young NS, Rosenberg SA. Hematologic effects of immunotherapy with lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 in cancer patients. Blood 1987; 69:1654-60; PMID:3495302.
28. Ettinghausen SE, Lipford EH 3rd, Mulé JJ, Rosenberg SA. Systemic administration of recombinant interleukin 2 stimulates in vivo lymphoid cell proliferation in tissues. J Immunol 1985; 135:1488-97; PMID:3891854.
29. Lenardo MJ. Interleukin-2 programs mouse alpha beta T lymphocytes for apoptosis. Nature 1991; 353:858-61; PMID:1944559; http://dx.doi.org/10.1038/353858a0.
30. Zheng L, Trageser CL, Willerford DM, Lenardo MJ. T cell growth cytokines cause the superinduction of molecules mediating antigen-induced T lymphocyte death. J Immunol 1998; 160:763-9; PMID:9551911.
31. Yardley DA, Burris HA 3rd, Markus T, Spigel DR, Greco FA, Mainwaring M, et al. Phase II trial of docetaxal plus imatinib mesylate in the treatment of patients with metastatic breast cancer. Clin Breast Cancer 2009; 9:237-42; PMID:19933079; http://dx.doi.org/10.3816/CBC.2009.n.040.
32. Maurel J, Martins AS, Poveda A, López-Guerrero JA, Cubedo R, Casado A, et al. Imatinib plus low-dose doxorubicin in patients with advanced gastrointestinal stromal tumors refractory to high-dose imatinib: a phase I-II study by the Spanish Group for Research on Sarcomas. Cancer 2010; 116:3692-701; PMID:20564079; http://dx.doi.org/10.1002/cncr.25111.
33. Matei D, Emerson RE, Schilder J, Menning N, Baldridge LA, Johnson CS, et al. Imatinib mesylate in combination with docetaxel for the treatment of patients with advanced, platinum-resistant ovarian cancer and primary peritoneal carcinomatosis : a Hoosier Oncology Group trial. Cancer 2008; 113:723-32; PMID:18618737; http://dx.doi.org/10.1002/cncr.23605.
34. Dugan E, Truax R, Meadows KL, Nixon AB, Petros WP, Favaro J, et al. A phase I dose-escalation study of imatinib mesylate (Gleevec/STI571) plus capecitabine (Xeloda) in advanced solid tumors. Anticancer Res 2010; 30:1251-6; PMID:20530436.
35. Ali Y, Lin Y, Gharibo MM, Gounder MK, Stein MN, Lagattuta TF, et al. Phase I and pharmacokinetic study of imatinib mesylate (Gleevec) and gemcitabine in patients with refractory solid tumors. Clin Cancer Res 2007; 13:5876-82; PMID:17908982; http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-0883.
36. Polite BN, Desai AA, Manchen B, Stadler WM. Combination therapy of imatinib mesylate and interferon-alpha demonstrates minimal activity and significant toxicity in metastatic renal cell carcinoma: results of a single- institution phase II trial. Clin Genitourin Cancer 2006; 4:275-80; PMID:16729911; http://dx.doi.org/10.3816/CGC.2006.n.007.
37. Heinrich MC, Owzar K, Corless CL, Hollis D, Borden EC, Fletcher CDM, et al. Correlation of kinase genotype and clinical outcome in the North American Intergroup Phase III Trial of imatinib mesylate for treatment of advanced gastrointestinal stromal tumor: CALGB 150105 Study by Cancer and Leukemia Group B and Southwest Oncology Group. J Clin Oncol 2008; 26:5360-7; PMID:18955451; http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2008.17.4284.

38. Chen LL, Chen X, Choi H, Sang H, Chen LC, Zhang H, et al. Exploiting antitumor immunity to overcome relapse and improve remission duration. Cancer Immunol Immunother 2012; 61:1113-24; PMID:22198309; http://dx.doi.org/10.1007/s00262-011-1185-1.
39. Balachandran VP, Cavnar MJ, Zeng S, Bamboat ZM, Ocuin LM, Obaid H, et al. Imatinib potentiates antitumor T cell responses in gastrointestinal stromal tumor through the inhibition of Ido. Nat Med 2011; 17:1094-100; PMID:21873989; http://dx.doi.org/10.1038/nm.2438.
40. Picard S, Titier K, Etienne G, Teilhet E, Ducint D, Bernard M-A, et al. Trough imatinib plasma levels are associated with both cytogenetic and molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia. Blood 2007; 109:3496-9; PMID:17192396; http://dx.doi.org/10.1182/blood-2006-07-036012.
41. Larson RA, Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, Riviere GJ, Krahnke T, et al.; IRIS (International Randomized Interferon vs STI571) Study Group. Imatinib pharmacokinetics and its correlation with response and safety in chronic-phase chronic myeloid leukemia: a subanalysis of the IRIS study. Blood 2008; 111:4022-8; PMID:18256322; http://dx.doi.org/10.1182/blood-2007-10-116475.
42. Singh N, Kumar L, Meena R, Velpandian T. Drug monitoring of imatinib levels in patients undergoing therapy for chronic myeloid leukaemia: comparing plasma levels of responders and non-responders. Eur J Clin Pharmacol 2009; 65:545-9; PMID:19214491; http://dx.doi.org/10.1007/s00228-009-0621-z.
43. Demetri GD, Wang Y, Wehrle E, Racine A, Nikolova Z, Blanke CD, et al. Imatinib plasma levels are correlated with clinical benefit in patients with unresectable/metastatic gastrointestinal stromal tumors. J Clin Oncol 2009; 27:3141-7; PMID:19451435; http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2008.20.4818.
44. Ghiringhelli F, Ménard C, Terme M, Flament C, Taieb J, Chaput N, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. J Exp Med 2005; 202:1075-85; PMID:16230475; http://dx.doi.org/10.1084/jem.20051511.
45. Casares N, Pequignot MO, Tesnière A, Ghiringhelli F, Roux S, Chaput N, et al. Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death. J Exp Med 2005; 202:1691-701; PMID:16365148; http://dx.doi.org/10.1084/jem.20050915.

Article 2 : Phase I clinical trial combining IM and IL-2: HLA-DR$^+$ NK cell levels correlate with disease outcome

Dans cette partie seront présentés les principaux résultats de l'article de Chaput N. *et al.* : **Phase I clinical trial combining IM and IL-2: HLA-DR+ NK cell levels correlate with disease outcome**.

L'essai clinique IMAIL-2 visant à évaluer la tolérance d'un traitement associant l'IM et l'IL-2 a été complété par un monitorage immunologique afin d'évaluer l'impact de cette association sur les effecteurs de l'immunité.

Après un cycle de traitement, une diminution du nombre de lymphocytes est observée chez l'ensemble des patients qui étaient déjà majoritairement en lymphopénie avant tout traitement (**Figure 1A**). L'étude des sous-populations lymphocytaires montre une diminution du nombre absolu de LT CD4$^+$, LT CD8$^+$ et LB (**Figures 1B, 1C, 1E**). Cette diminution du nombre de lymphocytes est imputable à l'IL-2 puisqu'aucune aggravation n'est observée après traitement par CTX et IM. D'ailleurs, à J14, soit après un cycle complet, on observe une corrélation inverse entre la dose d'IL-2 rapportée au poids (UI/kg) et la valeur absolue en lymphocytes ($r=-0.6432$; $p=0.009$) et LT CD8$^+$ ($r=-0.6899$; $p=0.004$) (**Figure 1F**). De manière intéressante, si les 2 populations de lymphocytes LT CD4$^+$ et LT CD8$^+$ sont diminuées suite à l'administration d'IL-2, elles ne le sont pas dans les mêmes proportions puisque le ratio CD4:CD8 augmente à J14 (**Figure 1E**).

Par contre, 5 jours d'IL-2 ne diminuent ni les NK ni les Treg. Leur nombre absolu reste en effet stable à J14 (**Figures 2A, 2C**). Par conséquent, les proportions de NK et Treg au sein des lymphocytes sont augmentées après un traitement combinant CTX, IM et IL-2 (**Figures 2B, 2D**). L'augmentation de Treg entre J10 et J14 reste cependant modérée puisque la proportion des Treg parmi les LT CD4$^+$ double pour seulement 3 patients, malgré 5 jours d'IL-2 (**Figure 2E**).

Pour évaluer l'activation des NK, nous avons analysé l'expression de différents marqueurs de surface : CD56 (**Figure 3A**), HLA-DR (**Figure 3B**) et TRAIL (**Figure 3C**). L'expression de ces 3 marqueurs est significativement augmentée à J14 et peut donc être attribuée à l'administration d'IL-2. Pour CD56, on note tout de même une augmentation des cellules NK CD56^{bright} dès J10 (**Figure 3A**). L'augmentation d'expression du marqueur HLA-DR est plus importante à la surface des NK CD56^{bright} qu'à la surface des cellules NK CD56^{dim} (**Figure 3D**). A J14, le pourcentage de cellules NK exprimant le marqueur TRAIL

est quant à lui corrélé à la dose d'IL-2 rapportée au poids (UI/kg) (**Figure 3E**). A J14, l'activité cytolytique des NK est augmentée comme le montre l'augmentation du marqueur d'exocytose CD107α (**Figure 3F**). La sécrétion d'IFN-γ par les NK n'est par contre pas modifiée par l'administration d'IL-2 (données non publiées).

Nous avons ensuite cherché à évaluer si les paramètres immunologiques pouvaient être associé à la survie globale ou à la survie sans progression. Pour chaque paramètre immunologique, la valeur médiane a été déterminée comme valeur seuil. Dès J1, un ratio CD4/CD8 élevé montre plus de chance de bénéficier d'une survie prolongée par rapport à un ratio CD4/CD8 faible (**Figure 4**). Par contre, le ratio CD4/CD8 ne permet pas de prédire une survie sans progression. De même, l'expression des marqueurs CD56 ou TRAIL à la surface des cellules NK après un cycle de l'association IM+IL-2 ne permet de prédire ni la survie globale, ni la survie sans progression dans cette cohorte de 17 patients. Enfin, l'expression du marqueur HLA-DR à la surface des NK est corrélée une meilleure survie dès J10 (**Figures 5B, 5C**).

RESEARCH PAPER

OncoImmunology 2:2, e23080; February 2013; © 2013 Landes Bioscience

Phase I clinical trial combining imatinib mesylate and IL-2

HLA-DR+ NK cell levels correlate with disease outcome

Nathalie Chaput,[1,2,3,4,*] Caroline Flament,[1,2,4] Clara Locher,[1,4,5] Mélanie Desbois,[1,2,5] Annie Rey,[6] Sylvie Rusakiewicz,[1,2,4] Vichnou Poirier-Colame,[1,2,4] Patricia Pautier,[1,7] Axel Le Cesne,[1,7] Jean-Charles Soria,[1,5,8] Angelo Paci,[1,9] Michelle Rosenzwajg,[10,11,12,13] David Klatzmann,[10,11,12,13] Alexander Eggermont,[1,5] Caroline Robert[1,7,†] and Laurence Zitvogel[1,2,4,5,†]

[1]Institut de Cancérologie Gustave Roussy; Villejuif, France; [2]Centre d'Investigation Clinique Biothérapie CICBT 507; Institut de Cancérologie Gustave Roussy; Villejuif, France; [3]Unité de Thérapie Cellulaire; Institut de Cancérologie Gustave Roussy; Villejuif, France; [4]Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale; U1015; Institut de Cancérologie Gustave Roussy; Villejuif, France; [5]Faculté de Médecine; Université Paris-Sud; Kremlin Bicêtre, France; [6]Service de Biostatistique et d'Epidémiologie; Institut de Cancérologie Gustave Roussy; Villejuif, France; [7]Département de Médecine; Institut de Cancérologie Gustave Roussy; Villejuif, France; [8]Service Innovations Thérapeutiques Essais Précoces (SITEP); Institut de Cancérologie Gustave Roussy; Villejuif, France; [9]Service Interdépartemental de Pharmacologie et d'Analyse du Médicament (SIPAM); Institut de cancérologie Gustave Roussy; Villejuif, France; [10]Université Pierre et Marie Curie Université; Paris, France; [11]Centre National de la Recherche Scientifique; Unité Mixte de Recherche 7211; Paris, France; [12]Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale; Unité S959; Paris, France; [13]Clinical Investigation Center in Biotherapy; Hôpital Pitié-Salpêtrière; Paris, France

[†]These authors contributed equally to this work.

Keywords: cancer, melanoma, NK cells, innate immunity, regulatory T cells, imatinib mesylate, interleukin-2

Abbreviations: AUC, area under the curve; C_{max}, maximal concentration; CTX, cyclophosphamide; GIST, gastrointestinal stromal tumor; IM, imatinib mesylate; IL, interleukin; NK, natural killer; PBMC, peripheral blood mononuclear cell; PFS, progression-free survival; OS, overall survival; TRAIL, tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand; Treg, regulatory T cell

We performed a Phase I clinical trial from October 2007 to October 2009, enrolling patients affected by refractory solid tumors, to determine the maximum tolerated dose (MTD) of interleukin (IL)-2 combined with low dose cyclophosphamide (CTX) and imatinib mesylate (IM). In a companion paper published in this issue of *OncoImmunology*, we show that the MTD of IL-2 is 6 MIU/day for 5 consecutive days, and that IL-2 increases the impregnation of both IM and of its main metabolite, CGP74588. Among the secondary objectives, we wanted to determine immunological markers that might be associated with progression-free survival (PFS) and/or overall survival (OS). The combination therapy markedly reduced the absolute counts of B, CD4+ T and CD8+ T cells in a manner that was proportional to IL-2 dose. There was a slight (less than 2-fold) increase in the proportion of regulatory T cells (Tregs) among CD4+ T cells in response to IM plus IL-2. The natural killer (NK)-cell compartment was activated, exhibiting a significant upregulation of HLA-DR, tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and CD56. The abundance of HLA-DR+ NK cells after one course of combination therapy positively correlated with both PFS and OS. The IL-2-induced rise of the CD4+:CD8+ T-cell ratio calculated after the first cycle of treatment was also positively associated with OS. Overall, the combination of IM and IL-2 promoted the rapid expansion of HLA-DR+ NK cells and increased the CD4+:CD8+ T-cell ratio, both being associated with clinical benefits. This combinatorial regimen warrants further investigation in Phase II clinical trials, possibly in patients affected by gastrointestinal stromal tumors, a setting in which T and NK cells may play an important therapeutic role.

Introduction

Although cancer immunotherapy has been used for a number of years, new strategies, including the blockage of immune checkpoints, have recently emerged. Combinational regimens involving several chemotherapeutic constitute a mainstay of oncology. Now, combining immunotherapeutic approaches with conventional chemotherapy stands out as promising strategies to increase response rates, circumvent chemoresistance and hence prolong patient survival. The identification of novel combination regimens and their characterization in terms of optimal dosage and schedule should help achieving these goals. Beyond the intrinsic capacity of a targeted anticancer agent to interfere with oncogene addiction and hence promote apoptosis, often

*Correspondence to: Nathalie Chaput; Email: nathalie.chaput@igr.fr
Submitted: 10/12/12; Revised: 11/28/12; Accepted: 12/01/12
http://dx.doi.org/10.4161/onci.23080
Citation: Chaput N, Flament C, Locher C, Desbois M, Rey A, Rusakiewicz S, et al. Phase I clinical trial combining imatinib mesylate and IL-2: HLA-DR+ NK cell levels correlate with disease outcome. OncoImmunology 2013; 2:e23080

unrecognized off-target activities of the drug under consideration on the key players of innate and cognate immunity dramatically influence therapeutic responses. Thus, the association of immunogenic chemotherapy with antibodies blocking major immune checkpoints, immunomodulators (such as Toll-like receptor agonists or cytokines), therapeutic vaccines, or adoptive T-cell transfer constitutes a promising immunochemotherapeutic approach.

Based on previous preclinical studies,[1-4] we developed an innovative strategy aimed at activating both T and natural killer (NK) cells, which combines metronomic cyclophosphamide (CTX), imatinib mesylate (IM) and interleukin (IL)-2. CTX is a DNA-alkylating agent belonging to the family of nitrogen mustards. Upon conversion to 4-hydroxycyclophosphamide by hepatic oxidases, CTX acquires cytotoxic properties.[5] Recent data indicate that, in contrast to the immunosuppressive properties of CTX at high doses, metronomic CTX regimens exert profound immunostimulatory and anti-angiogenic effects.[1,6,7] CTX controls dendritic cell (DC) homeostasis, promotes the secretion of interferon (IFN)α,[7] contributes to the induction of antitumor cytotoxic T lymphocytes (CTLs)[8] and to the proliferation of adoptively transferred T cells, induces the polarization of $CD4^+$ T cells toward T_H1 and/or T_H17 lymphocytes,[9] and reduced the abundance and functions of regulatory T cells (Treg), eventually favoring tumor regression.[1] Such immunostimulatory properties offer a new approach for the use of metronomic CTX, as current clinical successes obtained with CTX are based on high doses, which de facto are immunosuppressive.

The tyrosine kinase inhibitor IM was developed in the late 1990s as a targeted therapy for chronic myeloid leukemia patients bearing the *BCR-ABL* genetic rearrangement.[10-13] IM was first administered to patients with gastrointestinal stromal tumors (GIST) in 2001,[14] and—rapidly—two international Phase III clinical trials showed that IM can achieve disease control in 70–85% of patients with advanced GIST bearing *KIT* or *PDGFRA* (coding for the platelet-derived growth factor receptor α subunit) mutations, with a median progression-free survival (PFS) of 20–24 mo.[15-17] A number of immunological off-target effects have been reported for IM. IM can affect Treg functions by inhibiting the expression of forkhead box P3 (FOXP3), thereby enhancing the immunogenicity of anticancer vaccines.[18] By inhibiting oncogenic KIT signaling, IM was shown to shut down the expression of the immunosuppressive enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) by tumor cells, thereby promoting Treg apoptosis and $CD8^+$ T-cell activation in human and murine GIST models.[19] We have previoulsy reported that IM promote the DC/NK-cell cross-talk by acting on KIT-expressing bone marrow DCs, hence endowing them with the capacity to stimulate NK cells.[20] In animals bearing IM-resistant tumors, oral IM has been shown to promote the proliferation and activation of NK cells in the spleen concomitant to an NK cell-dependent reduction of the metastatic burden.[20] In GIST patients treated with IM for 2 mo, the DC-induced secretion of IFNγ by NK cells turned out to constitute a predictor of long-term therapeutic responses.[20,21] Finally, combining IM with IL-2 in mice bearing IM-resistant metastatic melanoma produced a synergistic anticancer effect.[3] In particular, high doses of IL-2 boosted the antitumor effects mediated by IM, via a mechanism dependent on $NK1.1^+$ cells, tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), and IFNγ. Such antitumor effects were associated with the intratumoral recruitment of a particular subset of innate immune cells harboring a hybrid phenotype between DCs and NK cells (MHC Class $II^+CD11c^+NK1.1^+B220^+$), which we named 'interferon-producing killer dendritic cells' (IKDCs). Indeed, IKDCs were capable of secreting IFNγ in response to tumor cells upon stimulation with IM and IL-2, as well as of killing tumor cell targets by a TRAIL-dependent mechanism.[3] The antitumor efficacy of IM plus IL-2 was compromised in mice bearing loss-of-function mutations in the IL-15 receptor α (IL-15Rα) or in Type I IFNs receptor 1, and was dependent on plasmacytoid DCs. IL-15Rα was required for the proliferation of IKDCs in the course of therapy with IM plus IL-2. The trans-presentation of IL-15 induced the expression of the C-C chemokine receptor Type 2 (CCR2) on IKDCs, and primed IKDCs to respond to Type I IFN by producing chemokine (C-C) ligand 2 (CCL2). Of note, the antitumor effects of IM plus IL-2 correlated with a CCL2-dependent recruitment of IKDCs but not $B220^-$ NK cells into the tumor bed.[2,22] We concluded that the IL-15-driven peripheral expansion and the CCL2-dependent intratumoral targeting of IKDCs constitute the checkpoints that dictate the antitumor efficacy of IM plus IL-2 in mice.

Given that Tregs inhibit NK-cell effector functions,[23] and that CTX impairs Treg homeostasis, restoring NK-cell functions,[1] we have conducted a Phase I trial combining CTX, IM and escalating doses of IL-2 (see companion paper published in *OncoImmunology* 2:e23079). One of the secondary objectives of this trial was to identify a human analog of mouse IKDCs or alternative immune parameters associated with clinical benefits in patients affected by refractory solid malignancies.

Results

The combination of IM and IL-2 drastically reduces the counts of most lymphocyte subsets. Most patients presented with lymphopenia at enrollment (1118 ± 100/mm^3), which worsened significantly ($p < 0.001$) after one cycle of therapy (600 ± 70/mm^3). This lymphopenic effect was attributable to the addition of IL-2, as no worsening was seen after CTX or IM (**Fig. 1A; Table S1**). The abundance of lymphocyte subsets including $CD4^+$ T cells, $CD8^+$ T cells, and B lymphocytes dropped (**Fig. 1B–D; Table S1**), whereas the absolute counts of NK and Treg cells remained stable (**Fig. 2A and C**; **Table S1**), resulting in an increased proportion of Treg and NK cells following the administration of IM plus IL-2 (**Fig. 2B and D**; **Table S1**). At the end of the first cycle of treatment (D14), there was an inverse correlation between the dose of IL-2/kg and the total number of lymphocytes ($R = -0.6432$; $p = 0.009$), $CD8^+$ T cells ($R = -0.6899$; $p = 0.004$) and NK cells ($R = -0.6470$; $p = 0.009$), as well as with Treg counts/mm^3 ($R = -0.5255$; $p = 0.04$) (**Fig. 1F and 2F**). Interestingly, and as already reported in HIV individuals receiving IL-2,[24] the $CD4^+$:$CD8^+$ T-cell ratio was increased at the end

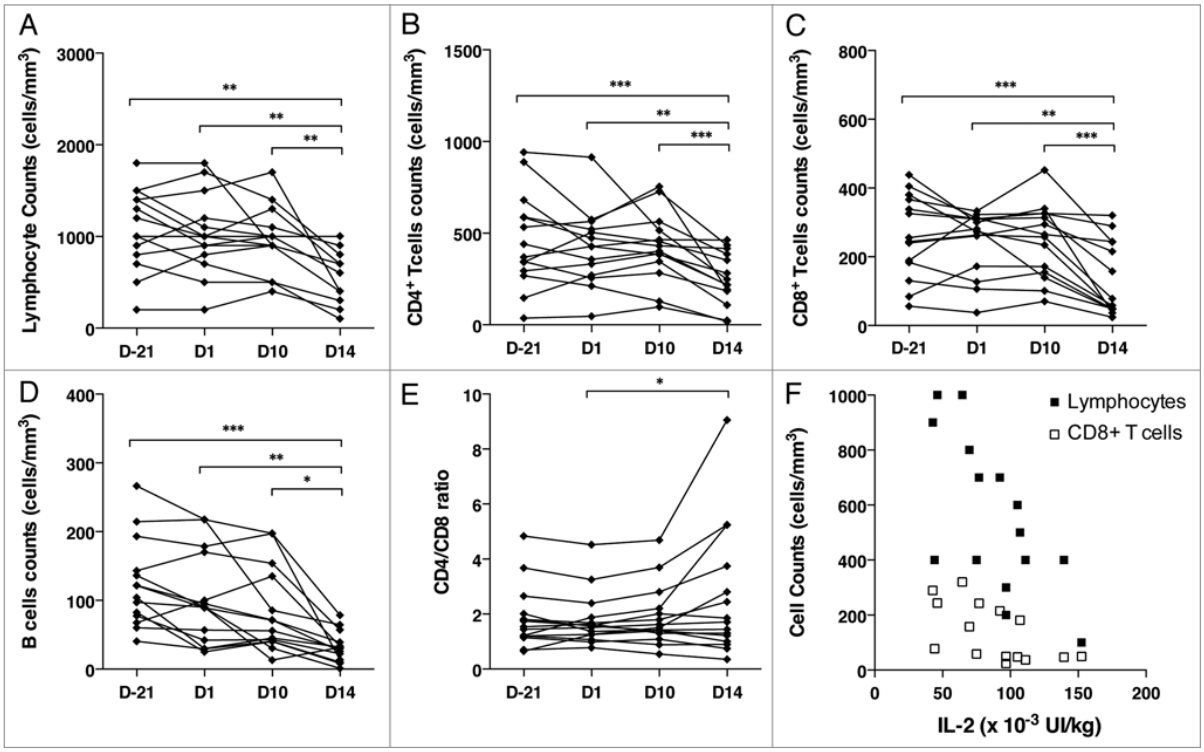


Figure 1. The drop in lymphocyte counts observed during imatinib mesylate + interleukin-2 (IL-2) therapy correlated with IL-2 dose. (**A–F**) Cytofluorometric quantification of all lymphocytes (**A**), $CD3^+CD4^+$ T cells (**B**), $CD3^+CD8^+$ T cells (**C**) and $CD3^-CD19^+$ B cells (**D**) in the blood of patients at baseline (D-21), before the initiation of imatinib mesylate (IM, D1), before the initiation of interleukin-2 (IL-2, D10) and at the completion of the first treatment cycle (D14). The $CD4^+$:$CD8^+$ T-cell ratio was determined at each point (**E**). At D14, lymphocyte and $CD8^+$ cell counts inversely correlated with IL-2 dose (**F**). Each dot represents the parameters of one patient. Statistical significance is indicated (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001).

of the combination therapy (p = 0.015; **Fig. 1E**). The relative abundance of Tregs decreased slightly after the administration of CTX and IM (p = 0.04; **Fig. 2D**). Hence, despite the use of IL-2,[25,26] we obserbed an increase greater than 2-fold in the proportion of Tregs (among $CD4^+$ T cells) in three patients (representing 20% of this cohort) after one cycle of therapy (**Fig. 2F**).

The combination of IM and IL-2 activates circulating NK cells. The activation of NK cells was assessed not only based on their expansion among all lymphocytes (**Fig. 2A and C**; **Table S1**) but also on the overexpression of CD56 (**Fig. 3A**; **Table S1**), HLA-DR (**Fig. 3B and Table S1**) and TRAIL (**Fig. 3C; Table S1**). Of note, HLA-DR molecules were mainly upregulated by the $CD56^{bright}$ NK-cell subset (**Fig. 3D**). The upregulation of all these activation markers was attributable to IL-2 (**Fig. 3A–C**), but the increased abundance of $CD56^{bright}$ NK cells was already significant at D10, when patients had not yet received IL-2 (**Fig. 3A**). There was a positive correlation between the IL-2 dose/kg and the expression of TRAIL by NK cells (R = 0.68; p = 0.004, **Fig. 3E**). Corroborating the results of cytofluorometric studies, the cytolytic functions of NK cells, as assessed by CD107a expression upon exposure to K562 cells, increased in response to the combinatorial regimen (**Fig. 3F**), whereas IFNγ secretion remained stable (data not shown).

Early parameters associated with clinical outcome. We next evaluated which among the T cell-related and NK cell-related immunological parameters monitored at each time point during the first cycle of treatment (D-21, D1, D10 and D14) would be associated with PFS and/or OS. For each parameter, we defined the median as the cut-off value at each time point.

The ratio of $CD4^+$:$CD8^+$ T cells observed after the CTX treatment (D1) predicted OS (p = 0.0321), and this trend was reinforced after IM (D10, p = 0.0015) and sustained after IL-2 (D14, p = 0.0015) (**Fig. 4A–D**). However, $CD4^+$:$CD8^+$ T-cell ratio failed to predict PFS in this clinical cohort. Neither the proportion of NK cells (defined as $CD56^+CD3^-$ lymphocytes) nor CD56 (proportion of $CD56^{dim}$ NK cells or $CD56^{bright}$ NK cells among $CD56^+CD3^-$ NK cells) or TRAIL expression on NK cells had a predictive value for PFS or OS (not shown). By contrast, the proportion of $HLA\text{-}DR^+$ NK cells observed after IM therapy (D10) was positively associated with PFS (p = 0.008; **Fig. 5A**) and OS (p = 0.01; **Fig. 5B**). This trend was reinforced at D14 for OS (p = 0.009; **Fig. 5C**). Notably, among $HLA\text{-}DR^+$ NK cells, only a high proportion of $CD56^{bright}HLA\text{-}DR^+$ (but not of $CD56^{dim}HLA\text{-}DR^+$) NK cells remained associated with prolonged OS after IM plus IL-2 therapy (D14, p = 0.009; **Fig. 5D**). IL-2-specific evaluation criteria such as the abundance of Tregs

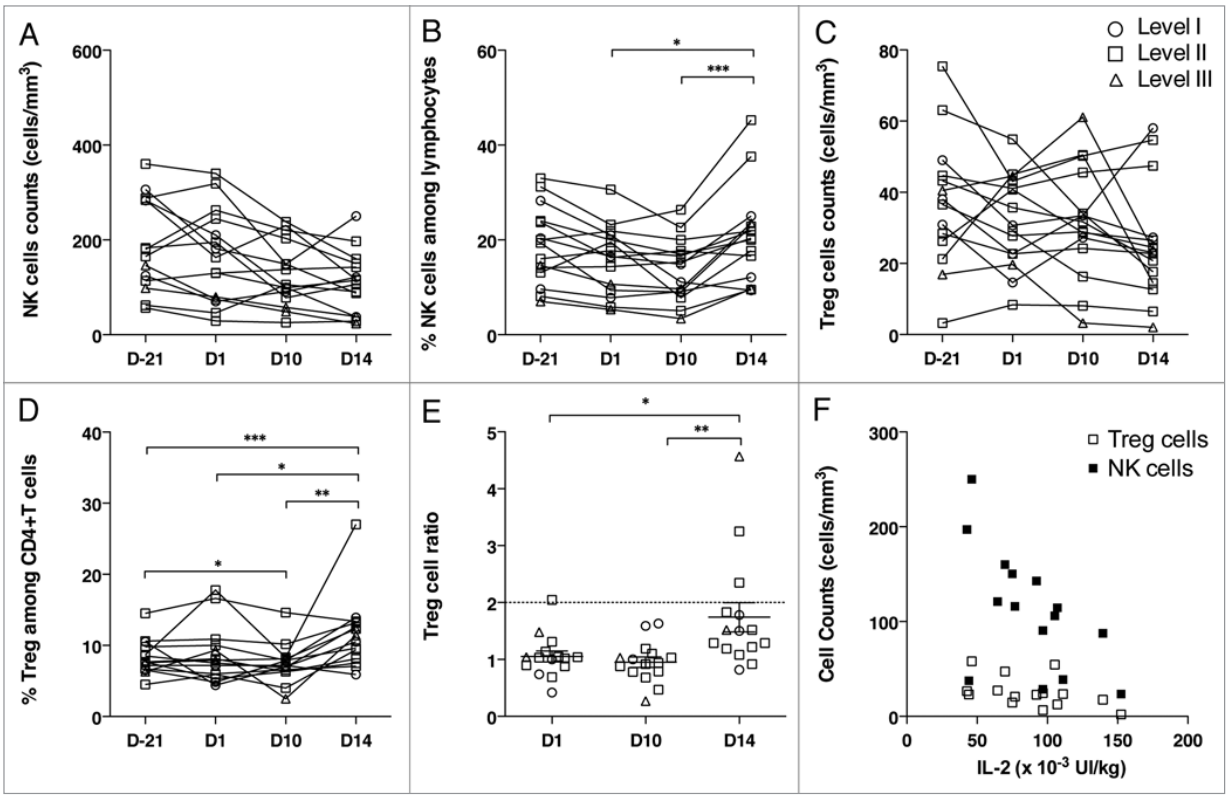


Figure 2. Interleukin-2-induced a rise in the proportions of natural killer and regulatory T cells. (**A–F**) Cytofluorometric quantification of natural killer (NK, $CD3^{-}CD56^{+}$) cells among all lymphocytes (**A and C**) and regulatory T cells (Tregs, $CD3^{+}CD4^{+}CD127^{low}CD25^{high}$) among $CD3^{+}CD4^{+}$ T cells (**B and D**) in the blood of patients at baseline (D-21), before the initiation of imatinib mesylate (IM, D1), before the initiation of interleukin-2 (IL-2, D10) and at the completion of the first treatment cycle (D14). The fold increase in Treg (determined by the ratio of Treg relative abundance between subsequent time points (D1/D-21; D10/D1; D14/D10) is depicted (**E**). NK cell and Treg levels numbers inversely correlated with IL-2 dose (**F**). Each dot represents the parameters of one patient. Statistical significance is indicated (*$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$).

(**Fig. 2**) or the circulating levels of soluble CD25 (see companion paper published in *OncoImmunology* 2:e23079) failed to correlate with PFS or OS (data not shown).

Discussion

The rationale for combining IM and IL-2 in this study relied upon the NK-cell immunostimulatory capacities of IM and upon preclinical studies demonstrating that IKDCs may mediate the TRAIL- and IFNγ-dependent tumoricidal activity of IM when combined with high doses of IL-2.[3] The results of this Phase I clinical trial indicate that (1) IL-2 can only be used at an intermediate dose (i.e., 6 MIU/day) when combined with IM (see companion paper published in *OncoImmunology* 2:e23079); (2) the combination of IM and IL-2 triggers NK-cell expansion and activation; (3) the ratio of $CD4^{+}$:$CD8^{+}$ T cells after CTX treatment may predict patient OS; (4) Tregs are not markedly by the combination of IM and IL-2, in spite of the presence of the latter, nor are they associated with disease outcome and (5) the presence of $HLA\text{-}DR^{+}$ and particularly $CD56^{bright}$ $HLA\text{-}DR^{+}$ NK cells after IM and IM plus IL-2 therapy is associated with PFS and/or OS.

Low doses of rIL-2 can activate high-affinity $IL\text{-}2R\alpha^{+}$ $CD56^{bright}$ NK cells, favor NK-cell differentiation from $IL\text{-}2R\alpha^{+}$ $CD34^{+}$ NK-cell precursors, and increase the proportions and functions of $CD4^{+}CD25^{+}$ regulatory T cells. Therefore, the question arises as to whether IM might have a positive effect on NK-cell function and/or a negative effect on Treg abundance or function, and hence bring about clinical benefits for cancer patients. It has previously been demonstrated that IM exerts inhibitory effects on the immunosuppressive activity of $CD4^{+}CD25^{high}$ T cells. Balachandran et al. reported that—in a GIST mouse tumor model and in GIST patients bearing *KIT* mutations—IM hampers IDO activity, thereby promoting the apoptotic demise of tumor-infiltrating Tregs and increasing the $CD8^{+}$ T-cell:Treg ratio in the tumor bed.[19] These authors attributed the therapeutic success of IM at least partly to the reinvigoration of $CD8^{+}$ T cells in the absence of Tregs, an effect that could be boosted by blocking cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA). Larmonier and collaborators demonstrated that IM directly affects FOXP3 expression, signal transducer and activator of transcription (STAT)3 and STAT5 activation, as well as the phosphorylation of ZAP70 (ζ chain-associated protein kinase 70) and LAT (linker

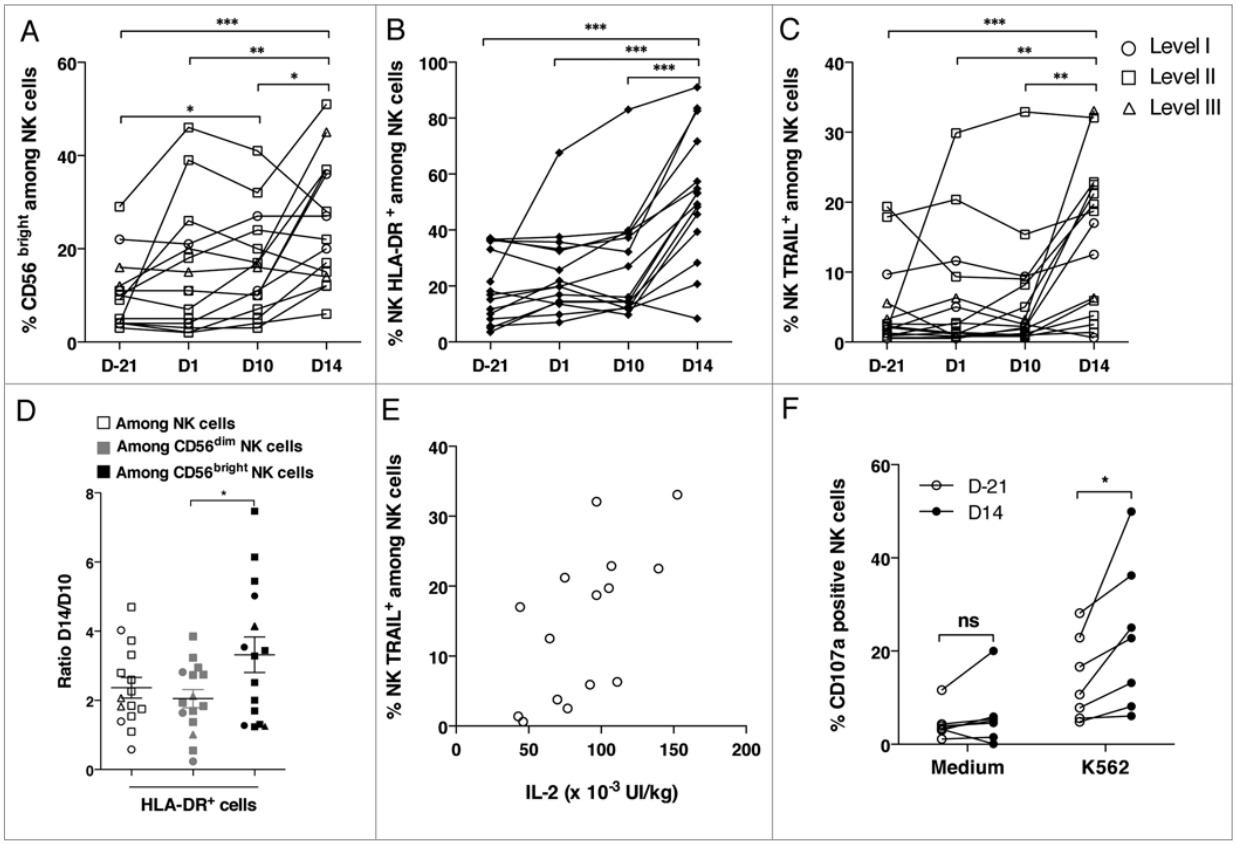


Figure 3. Activation of peripheral natural killer cells in response to imatinib mesylate alone or combined with interleukin-2. (**A–F**) Cytofluorometric quantification of CD56 (**A**), HLA-DR (**B**), and TRAIL (**C**) expression on $CD3^-D56^+$ lymphocytes in the blood of patients at baseline (D-21), before the initiation of imatinib mesylate (IM, D1), before the initiation of interleukin-2 (IL-2, D10) and at the completion of the first treatment cycle (D14). Fold increase from D10 to D14 (D14/D10) of the proportion of $HLA\text{-}DR^+$ cells among $CD3^-CD56^+$, $CD3^-CD56^{dim}$ and $CD3^-CD56^{bright}$ natural killer (NK) cells (**D**). The percentage of TRAIL-expressing NK cells positively correlated with IL-2 dose (**E**). (**F**) Degranulation capacity of NK cells (assessed by CD107a expression) obtained from patients at baseline (D-21) and after one cycle of treatment (D14), upon exposure to K562 cells. Each dot represents the parameters of one patient. Statistical significance is indicated (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001).

for activation of T cells) in human Tregs in vitro, at clinically relevant concentrations, and can impair the frequency and function of Tregs in mice.[18] In the current study, we found that: (i) CTX and IM treatment can reduce the proportion of regulatory T cells in patients with advanced cancer (**Fig. 2D**); and (ii) IM plus 6 MIU/day IL-2 (our MTD) increased the relative abundance of Trges only slightly, with a change of less than 2-fold on average: 1.5 ± 0.68 (0.82–4.57) (**Fig. 2E**). These data contrast with those previously reported for patients affected by autoimmune or chronic inflammatory conditions. Saadoun et al. described the use of low doses of IL-2 (1.5 MIU/day for 5 consecutive days in the first cycle, followed by 3 MIU/day for 5 d in cycles 2–4) for the treatment of hepatitis C virus (HCV)-induced vasculitis, and observed a 2-fold increase (after the first cycle) and a 3–4-fold increase (after the second, third and fourth cycle) in Tregs.[26] Koreth et al. reported that—in patients affected by graft-vs.-host disease—low doses of IL-2 (1 MIU/m^2/day for 8 weeks) can expand Tregs by eight times, hence causing a relief of symptoms in 12 out of 23 patients.[25] The three patients in our cohort who received the lowest dose of IL-2 (3 MIU/day, i.e., 1.7–2 MIU/m^2/day) had an increase in Treg abundance of only 0.82, 1.5, and 1.78 times, respectively. We ascribe such differences to (1) the adjunctive therapy with IM, which might mediate pharmacodynamic changes in IL-2 bioactivity or directly reduce Treg numbers; (2) differences in the schedule of IL-2 administration; (3) the CTX-based conditioning regimen (which is known to interfere with Treg number and function) and (4) patient characteristics (cancer patients have comparatively higher Treg numbers at baseline). We were able to exclude the possibility that IM interfered with the pharmacokinetics or pharmacodynamics of IL-2 in our Phase I study by demonstrating that the peak concentrations and half-life of IL-2 as observed in patients co-treated with IM were similar to those documented for the subcutaneous injection of IL-2 only (see companion paper published in *OncoImmunology* 2:e23079), and that the circulating concentrations of soluble CD25 were in the same range as those observed by Saadoun et al. (D. Klatzmann, personal communication). However, in contrast with our previous study,[27] a Phase I clinical

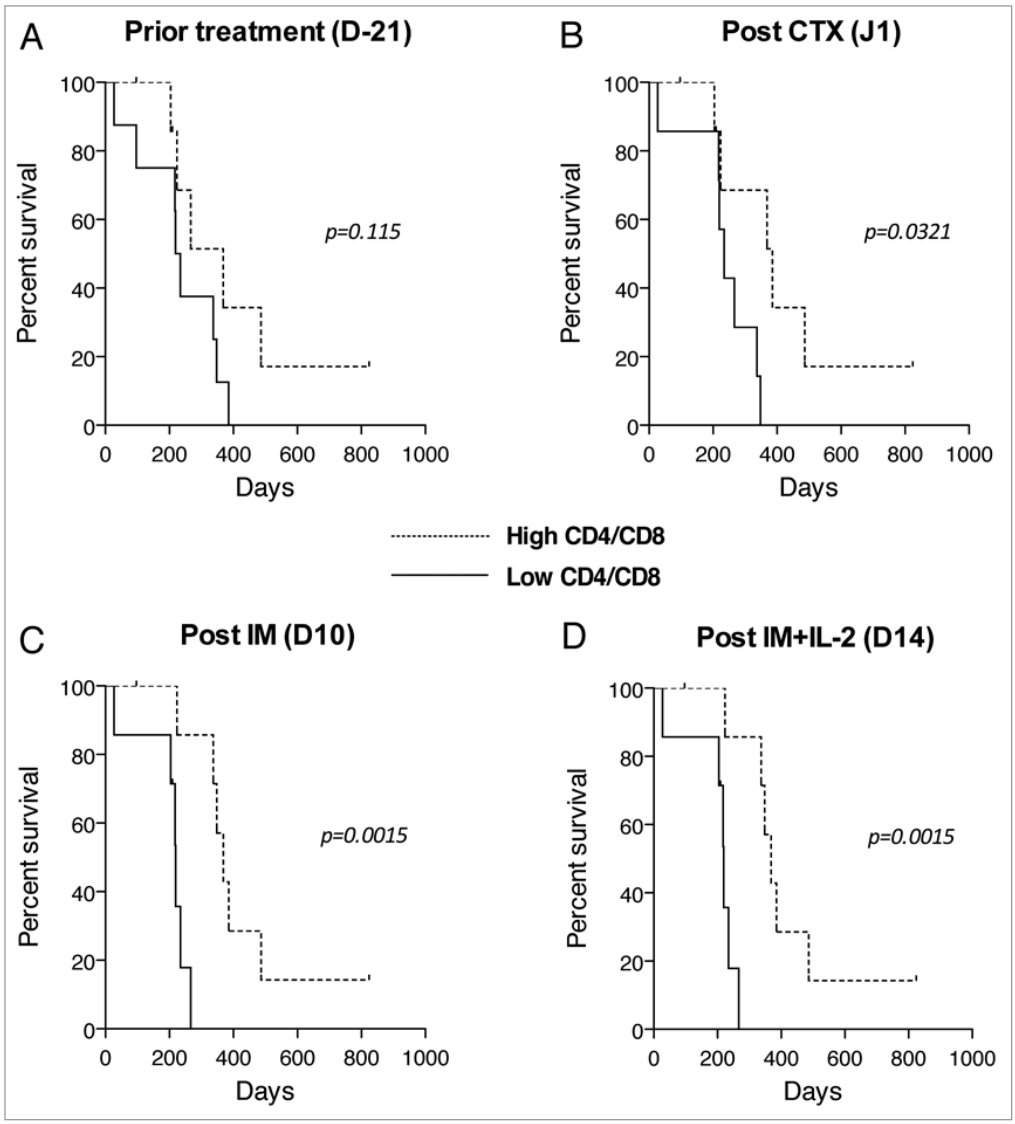


Figure 4. The CD4⁺:CD8⁺ T-cell ratio is a predictor of overall survival post-cyclophosphamide. (**A–D**) The median of the CD4⁺:CD8⁺ T-cell ratio measured at each time point, that is baseline (D-21), before the initiation of imatinib mesylate (IM, D1), before the initiation of interleukin-2 (IL-2, D10) and at the completion of the first treatment cycle (D14), was used as a cut-off value to determine two groups of patients, high CD4⁺:CD8⁺ patients (value > median, dotted line) and low CD4⁺:CD8⁺ patients (value < median, continuous line). Overall survival in these two groups was compared by means of Mantel-Cox log-rank tests. Curves and p values are shown for D-21 (**A**), D1 (**B**), D10 (**C**) and D14 (**D**).

trial combining stem cell factor (SCF, a KIT ligand) with IL-2 in HIV-1-infected and cancer patients reported an expansion of NK cells (2.2-fold, for the $CD56^{bright}$ subset) but a 6-fold rise in Tregs. Hence, it remains speculative whether, in the course of IL-2 therapy, blocking c-KIT signaling would favor the expansion of NK cells over that of Tregs while the administration of SCF plus IL-2 would cause Tregs to preferentially expand.[28]

Our study highlighted the predictive role of the CD4⁺:CD8⁺ T-cell ratio on OS. Indeed, one of the hallmarks of IL-2 bioactivity in HIV-1-infected patients receiving low IL-2 doses was the reconstitution of the CD4⁺ T cell compartment, possibly by neo-thymopoiesis.[24] To address this question, Levy et al. comprehensively investigated the nature of IL-2-induced CD4⁺ T cells, and showed that the administration of IL-2 prior to the interruption of highly active antiretroviral therapy (HAART) during non-advanced HIV disease prolongs the period before HAART resumption as well as survival, in spite of the presence of replicating HIV-1. These effects of IL-2 may stem from the expansion of $CD4^+CD45RO^-CD25^+FOXP3^+$ cells exerting weak immunosuppressive functions, as well as that of naive and central memory CD4⁺ T cells.[29-31] In another study, HAART alone was compared with HAART plus IL-2 (6 MIU/day on days 1–5 and 8–12 of a 28

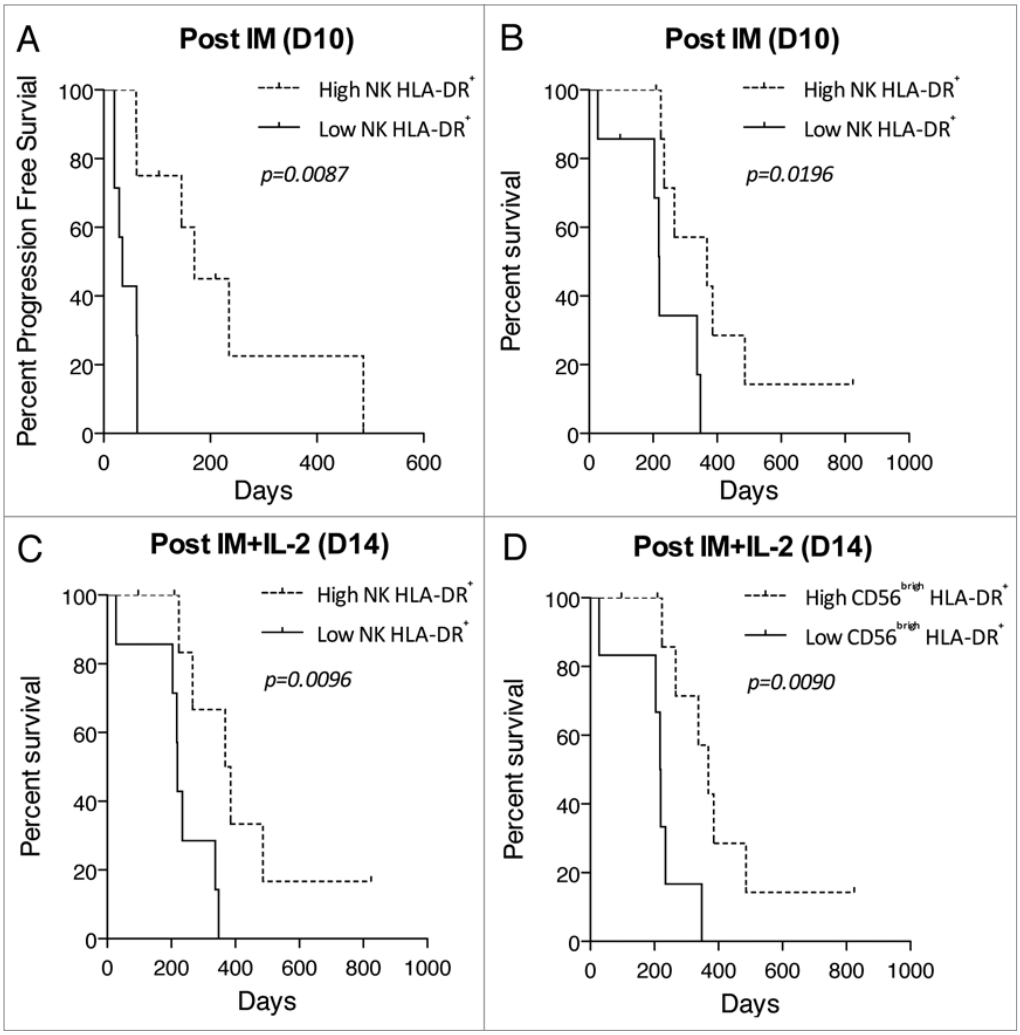


Figure 5. HLA-DR$^+$ natural killer cell levels are positively associated with progression-free and overall survival. (**A–D**) The median of the relative abundance of HLA-DR$^+$ or CD56^{bright} HLA-DR$^+$ natural killer (NK) measured at each time point, that is baseline (D-21), before the initiation of imatinib mesylate (IM, D1), before the initiation of interleukin-2 (IL-2, D10) and at the completion of the first treatment cycle (D14), was used as a cut-off value to determine two groups of patients, high NK HLA-DR$^+$ or high CD56^{bright} HLA-DR$^+$ patients (values > median, dotted lines) and low NK HLA-DR$^+$ or low CD56^{bright} HLA-DR$^+$ patients (values < median, continuous lines). Progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) in these two groups were compared by means of Mantel-Cox log-rank tests. Curves and p values depicting PFS are shown for HLA-DR$^+$ NK cells at D10 (**A**). Curves and p values depicting OS are shown for HLA-DR$^+$ NK cells at D10 (**B**) and D14 (**C**), as well as for CD56^{bright} HLA-DR$^+$ NK cells at D14 (**D**).

d-cycle for a total of six cycles).[32] In these HIV-1-infected patients, the authors observed a marked induction of CD4$^+$ T cells, leading to an increased CD4$^+$:CD8$^+$ T-cell ratio, a drop in viremia after 24 weeks, and a 3–4-fold increase in CD4$^+$CD25$^+$ T cells.[32] In our study, after one cycle of treatment, we could not detect any increase in the number or frequency of CD4$^+$ or CD8$^+$ T cells (**Fig. 1**). An increase in CD4$^+$:CD8$^+$ T-cell ratio was observed only after the administration of IM plus IL-2, but a higher ratio after CTX treatment appeared to be linked to OS, and was maintained throughout treatment (post-IM and post-IM plus IL-2; **Fig. 4**). This observation might stem from the development of T_H1/T_H17-skewed TCR-dependent responses in response to CTX, as previously described for this cohort of patients,[9] which could be maintained and/or increased by IM or IM plus IL-2. However, this hypothesis remains to be formally addressed.

The results of this clinical trial indicate that NK-cell-related biomarkers (CD56, HLA-DR and TRAIL) are significantly modulated by the combination of IM plus IL-2. Caligiuri et al. pioneered this field, showing that low doses of IL-2 induce the accumulation of CD56$^+$ NK cells, while periodic intermediate-dose pulsing can boost their cytotoxic functions. The degree of IL-2-induced NK-cell expansion was somewhat correlated with the clinical benefit of cancer patients, and was negatively associated with the development of neutralizing anti-IL-2

antibodies.[33-36] Similar findings were obtained in HIV-1-infected patients,[37] who manifested a dramatic increase in CD56^{bright} NK cells.[36] How does IM affect the expansion or activation if NK cells as induced by IM? Although the absolute counts of circulating NK cells failed to increase, the proportion of NK cells among lymphocytes as well as the abundance of CD56^{bright} or HLA-DR$^+$ or TRAIL$^+$ NK cells among total NK cells raised by 2-fold, 2–3-fold, 2–3-fold and 4-fold, respectively. Therefore, it is tempting to speculate that uncoupling the innate immunostimulatory effects of IL-2 from its Treg-enhancing effects can be achieved by combining it with IM. Chen et al. combined IM with high doses of pegylated (peg)IFNα2b for 4 weeks in patients with Stage III/IV GIST and reported on the first eight patients who exhibited an objective response. PegIFNα2b promoted a T_H1 polarization of circulating T and NK cells and tumor infiltration by granzyme B- and FASL-expressing CD56$^+$ cells, colocalizing with CD45RO$^+$CD8$^+$ or CD4$^+$ cells.[38] It remains unclear how IL-2 vs. pegIFNα2b differentially activate T and NK cells in GIST patients undergoing IM-based therapy. In our study, IM combined with IL-2 appeared to preferentially amplify CD56^{bright} HLA-DR$^+$ NK cells. As reported by others, HLA-DR could mark a subset of human NK cells that do not simply undergo activation, contrary to CD69, which is upregulated on the vast majority of NK cells within 18 h of IL-2 stimulation.[39,40] Because NK cells derived by clonal expansion of a single seed cell are relatively homogeneous in the expression levels of HLA-DR, Evans and colleagues have suggested that HLA-DR$^+$ NK cells that are expanded by IL-2 ex vivo may originate from a HLA-DR-expressing precursor cell.[39] These HLA-DR$^+$ NK cells are more potent than their HLA-DR$^-$ counterparts with regard to proliferation and degranulation (but not IFNγ secretion) in response to IL-2 or IL-15.[39] In line with these data, we found that HLA-DR$^+$ NK cells as induced by IM plus IL-2 therapy exhibit a greater capacity for degranulation but no enhanced IFNγ secretion. Human HLA-DR$^+$ NK cells could be analogous to murine IKDCs.[3] To date, several groups have shown that NK cells expressing MHC Class II molecules might represent a distinct subset of immature NK cells in mice and humans.[39,41,42] In the current study, we have demonstrated that the combination of IM plus IL-2 in patients with advanced cancer induces the expansion of HLA-DR$^+$TRAIL$^+$ NK cells exhibiting potent degranulation capacity, yet only the expansion of HLA-DR$^+$ NK cells was positively associated with disease outcome. The study of the transcriptional profile, migratory pattern and antigen-presenting functions of HLA-DR$^+$TRAIL$^+$ NK cells should unravel whether these cells, as expanded by IM plus IL-2 therapy, truly represent the human analog of IKDCs that we and others described in 2006.[3,43]

The combination of CTX, IM and IL-2 constitutes a T- and NK-cell immunomodulatory regimen suitable for patients bearing advanced solid malignancies. We found that T and NK cell-related parameters can be linked to PFS and/or OS in these patients. There appears to be no link of causality between these biomarkers of OS, since no measurements were done beyond day 14, implying that we could not demonstrate that these biomarkers are maintained at subsequent cycles. Still, we believe that this immunotherapeutic regimen could be of interest in patients affected by GIST or chronic myeloid leukemia, two settings in which it could synergize with oncogene addiction-targeting agents.

Materials and Methods

Patients. Adult patients with measurable or evaluable solid malignancies that were refractory to standard therapy were eligible for this study, a Phase I clinical trial (IMAIL-2) run at the Gustave-Roussy Institute and approved by the Kremlin Bicêtre Hospital ethics committee (number 07-019) as well as by the Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (A70385-27) in 2007. The patients enrolled in the IMAIL-2 trial and the treatment schedule have been exhaustively described in the companion paper (*OncoImmunology* 2:e23079).

Blood sampling. Blood was collected at cycle 1 before treatment (D-21) after metronomic cyclophosphamide (D1) and after IM treatment (D10), and at the end of IM+IL-2 treatment (D14). No blood sampling was done in subsequent cycles. For each patient, 50 mL of blood were collected in a tube containing heparin and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated on a Ficoll gradient. Optionally, PBMCs were then frozen in liquid nitrogen until assessment of T-cell and NK-cell abundance, phenotype or function.

Multicolor cytofluorometric studies. PBMC subsets from fresh blood or from thawed vials were analyzed. Cell acquisition and analysis were performed using a FACSCalibur (BD Biosciences) or CyAN (Beckman Coulter) flow cytometer. Data were analyzed with Cell Quest (BD Bioscience) or Flowjo (Tree Star Inc.). Monoclonal antibodies conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC), phycoerythrin (PE), peridinin–chlorophyll–protein complex (PerCP), or allophycocyanin (APC) were used, as follows: MultiTest CD3-FITC/CD8-PE/CD45-PercP/CD4-APC reagent (342417), MultiTest CD3-FITC/CD16 + 56-PE/CD45-PercP/CD19-APC reagent (342416), CD3-FITC (345763), CD3-PerCP (345766), CD8-FITC (555366), CD3-PE (34577), CD45RA-FITC (555488), CD27-FITC (340424), HLA-DR-PE (347401), CD69-PE (555531), CCR6-PE (561019), CCR7-PE (552176) (all from BD Biosciences); CD127-FITC (11-1278), PD1-PE (12-9969) CD117-PE (12-1179-73) and TRAIL-PE (12-9927) (all from eBiosciences); CD8-APC (IM2469), CD4-APC (IM2468) and CD56-APC (IM2474) (all from Beckman Coulter); CD25-PE (130-091-024) NKG2D-PE (130-092-672) and NKp44-PE (130-092-480) (all from Miltenyi Biotec); CXCR3-PE (FAB3898A, from IR&D Systems, Inc.); C3XCR1-PE (D070–5, from MBL Co. Ltd). Cell subsets were analyzed after exclusion of doublets and dead cells. Tregs were defined as CD3$^+$CD4$^+$CD25^{high}CD127^{low} cells and NK cells were defined as CD3$^-$CD56$^+$ cells. For the detection of NK-cell degranulation and intracellular cytokine production, thawed PBMCs were cocultured with K562 cells (E/T: 10/1) or medium in the presence of a protein transport inhibitor (Golgi-Stop; from BD Biosciences) for 5 h and then stained with ViViD Yellow, CD3-FITC, CD56-PC7 (A21692; from Beckman Coulter),

and—after fixation and permeabilization in Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences, 51-2090KZ)—anti-IFNγ-APC (Miltenyi, 130-091-640) plus CD107a-PE (BD Biosciences, 555801).

Statistical analyses. Descriptive data were compared using the χ^2 test or Fisher's exact test for proportions, or the Wilcoxon rank-sum test for continuous measures. Correlation analyses between two parameters were performed by using the Pearson test. OS and PFS were estimated using the Kaplan-Meier method. OS was defined as time from diagnosis to death from any cause or to last follow-up if no death, and PFS was defined as time from diagnosis to progression or to last follow-up if no progression. Patients who had not experienced an event at the time of analysis were censored at the date of last follow-up. Comparisons of PFS and/or OS were performed using Mantel-Cox log-rank tests.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

This work was supported by Novartis SA, Institut National du Cancer (INCa), la Ligue contre le cancer (LIGUE labelisée, Zitvogel L.), l'Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC), Fondation pour la Recherche Médicale, and Fondation de France. The authors thank Lorna Saint Ange (Institut Gustave Roussy) for editing.

Supplemental Materials

Supplemental materials may be found here:
www.landesbioscience.com/journals/oncoimmunology/article/23080

References

1. Ghiringhelli F, Menard C, Puig PE, Ladoire S, Roux S, Martin F, et al. Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4+CD25+ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients. Cancer Immunol Immunother 2007; 56:641-8; PMID:16960692; http://dx.doi.org/10.1007/s00262-006-0225-8.
2. Mignot G, Ullrich E, Bonmort M, Ménard C, Apetoh L, Taieb J, et al. The critical role of IL-15 in the antitumor effects mediated by the combination therapy imatinib and IL-2. J Immunol 2008; 180:6477-83; PMID:18453565.
3. Taieb J, Chaput N, Ménard C, Apetoh L, Ullrich E, Bonmort M, et al. A novel dendritic cell subset involved in tumor immunosurveillance. Nat Med 2006; 12:214-9; PMID:16444265; http://dx.doi.org/10.1038/nm1356.
4. Taieb J, Chaput N, Schartz N, Roux S, Novault S, Ménard C, et al. Chemoimmunotherapy of tumors: cyclophosphamide synergizes with exosome based vaccines. J Immunol 2006; 176:2722-9; PMID:16493027.
5. Emadi A, Jones RJ, Brodsky RA. Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. Nat Rev Clin Oncol 2009; 6:638-47; PMID:19786984; http://dx.doi.org/10.1038/nrclinonc.2009.146.
6. Sistigu A, Viaud S, Chaput N, Bracci L, Proietti E, Zitvogel L. Immunomodulatory effects of cyclophosphamide and implementations for vaccine design. Semin Immunopathol 2011; 33:369-83; PMID:21611872; http://dx.doi.org/10.1007/s00281-011-0245-0.
7. Schiavoni G, Sistigu A, Valentini M, Mattei F, Sestili P, Spadaro F, et al. Cyclophosphamide synergizes with type I interferons through systemic dendritic cell reactivation and induction of immunogenic tumor apoptosis. Cancer Res 2011; 71:768-78; PMID:21156650; http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2788.
8. van der Most RG, Currie AJ, Cleaver AL, Salmons J, Nowak AK, Mahendran S, et al. Cyclophosphamide chemotherapy sensitizes tumor cells to TRAIL-dependent CD8 T cell-mediated immune attack resulting in suppression of tumor growth. PLoS One 2009; 4:e6982; PMID:19746156; http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0006982.
9. Viaud S, Flament C, Zoubir M, Pautier P, LeCesne A, Ribrag V, et al. Cyclophosphamide induces differentiation of Th17 cells in cancer patients. Cancer Res 2011; 71:661-5; PMID:21148486; http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1259.
10. le Coutre P, Mologni L, Cleris L, Marchesi E, Buchdunger E, Giardini R, et al. In vivo eradication of human BCR/ABL-positive leukemia cells with an ABL kinase inhibitor. J Natl Cancer Inst 1999; 91:163-8; PMID:9923858; http://dx.doi.org/10.1093/jnci/91.2.163.
11. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, et al. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. Nat Med 1996; 2:561-6; PMID:8616716; http://dx.doi.org/10.1038/nm0596-561.
12. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. N Engl J Med 2001; 344:1031-7; PMID:11287972; http://dx.doi.org/10.1056/NEJM200104053441401.
13. Buchdunger E, Zimmermann J, Mett H, Meyer T, Müller M, Druker BJ, et al. Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. Cancer Res 1996; 56:100-4; PMID:8548747.
14. Joensuu H, Roberts PJ, Sarlomo-Rikala M, Andersson LC, Tervahartiala P, Tuveson D, et al. Effect of the tyrosine kinase inhibitor STI571 in a patient with a metastatic gastrointestinal stromal tumor. N Engl J Med 2001; 344:1052-6; PMID:11287975; http://dx.doi.org/10.1056/NEJM200104053441404.
15. Demetri GD, von Mehren M, Blanke CD, Van den Abbeele AD, Eisenberg B, Roberts PJ, et al. Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. N Engl J Med 2002; 347:472-80; PMID:12181401; http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa020461.
16. Blanke CD, Rankin C, Demetri GD, Ryan CW, von Mehren M, Benjamin RS, et al. Phase III randomized, intergroup trial assessing imatinib mesylate at two dose levels in patients with unresectable or metastatic gastrointestinal stromal tumors expressing the kit receptor tyrosine kinase: S0033. J Clin Oncol 2008; 26:626-32; PMID:18235122; http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2007.13.4452.
17. Gastrointestinal Stromal Tumor Meta-Analysis Group (MetaGIST). Comparison of two doses of imatinib for the treatment of unresectable or metastatic gastrointestinal stromal tumors: a meta-analysis of 1,640 patients. J Clin Oncol 2010; 28:1247-53; PMID:20124181; http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2009.24.2099.
18. Larmonier N, Janikashvili N, LaCasse CJ, Larmonier CB, Cantrell J, Situ E, et al. Imatinib mesylate inhibits CD4+ CD25+ regulatory T cell activity and enhances active immunotherapy against BCR-ABL- tumors. J Immunol 2008; 181:6955-63; PMID:18981115.
19. Balachandran VP, Cavnar MJ, Zeng S, Bamboat ZM, Ocuin LM, Obaid H, et al. Imatinib potentiates antitumor T cell responses in gastrointestinal stromal tumor through the inhibition of Ido. Nat Med 2011; 17:1094-100; PMID:21873989; http://dx.doi.org/10.1038/nm.2438.
20. Borg C, Terme M, Taïeb J, Ménard C, Flament C, Robert C, et al. Novel mode of action of c-kit tyrosine kinase inhibitors leading to NK cell-dependent antitumor effects. J Clin Invest 2004; 114:379-88; PMID:15286804.
21. Ménard C, Blay JY, Borg C, Michiels S, Ghiringhelli F, Robert C, et al. Natural killer cell IFN-gamma levels predict long-term survival with imatinib mesylate therapy in gastrointestinal stromal tumor-bearing patients. Cancer Res 2009; 69:3563-9; PMID:19351841; http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-3807.
22. Ullrich E, Bonmort M, Mignot G, Jacobs B, Bosisio D, Sozzani S, et al. Trans-presentation of IL-15 dictates IFN-producing killer dendritic cells effector functions. J Immunol 2008; 180:7887-97; PMID:18523252.
23. Ghiringhelli F, Ménard C, Terme M, Flament C, Taieb J, Chaput N, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. J Exp Med 2005; 202:1075-85; PMID:16230475; http://dx.doi.org/10.1084/jem.20051511.
24. Marchetti G, Meroni L, Molteni C, Bandera A, Franzetti F, Galli M, et al. Interleukin-2 immunotherapy exerts a differential effect on CD4 and CD8 T cell dynamics. AIDS 2004; 18:211-6; PMID:15075538; http://dx.doi.org/10.1097/00002030-200401230-00010.
25. Koreth J, Matsuoka K, Kim HT, McDonough SM, Bindra B, Alyea EP 3rd, et al. Interleukin-2 and regulatory T cells in graft-versus-host disease. N Engl J Med 2011; 365:2055-66; PMID:22129252; http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1108188.
26. Saadoun D, Rosenzwajg M, Joly F, Six A, Carrat F, Thibault V, et al. Regulatory T-cell responses to low-dose interleukin-2 in HCV-induced vasculitis. N Engl J Med 2011; 365:2067-77; PMID:22129253; http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1105143.
27. Matos ME, Schnier GS, Beecher MS, Ashman LK, William DE, Caligiuri MA. Expression of a functional c-kit receptor on a subset of natural killer cells. J Exp Med 1993; 178:1079-84; PMID:7688785; http://dx.doi.org/10.1084/jem.178.3.1079.
28. Shah MH, Freud AG, Benson DM Jr., Ferkitich AK, Dezube BJ, Bernstein ZP, et al. A phase I study of ultra low dose interleukin-2 and stem cell factor in patients with HIV infection or HIV and cancer. Clin Cancer Res 2006; 12:3993-6; PMID:16818697; http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-0268.

29. Kovacs JA, Lempicki RA, Sidorov IA, Adelsberger JW, Sereti I, Sachau W, et al. Induction of prolonged survival of CD4+ T lymphocytes by intermittent IL-2 therapy in HIV-infected patients. J Clin Invest 2005; 115:2139-48; PMID:16025158; http://dx.doi.org/10.1172/JCI23196.
30. Lévy Y, Thiébaut R, Gougeon ML, Molina JM, Weiss L, Girard PM, et al.; ILIADE Study Group. Effect of intermittent interleukin-2 therapy on CD4+ T-cell counts following antiretroviral cessation in patients with HIV. AIDS 2012; 26:711-20; PMID:22301410; http://dx.doi.org/10.1097/QAD.0b013e3283519214.
31. Sereti I, Imamichi H, Natarajan V, Imamichi T, Ramchandani MS, Badralmaa Y, et al. In vivo expansion of CD4CD45RO-CD25 T cells expressing foxP3 in IL-2-treated HIV-infected patients. J Clin Invest 2005; 115:1839-47; PMID:15937547; http://dx.doi.org/10.1172/JCI24307.
32. De Paoli P, Zanussi S, Caggiari L, Bortolin MT, D'Andrea M, Simonelli C, et al. Kinetics of lymphokine production in HIV+ patients treated with highly active antiretroviral therapy and interleukin 2. J Clin Immunol 1999; 19:317-25; PMID:10535609; http://dx.doi.org/10.1023/A:1020547826191.
33. Caligiuri MA, Murray C, Robertson MJ, Wang E, Cochran K, Cameron C, et al. Selective modulation of human natural killer cells in vivo after prolonged infusion of low dose recombinant interleukin 2. J Clin Invest 1993; 91:123-32; PMID:7678599; http://dx.doi.org/10.1172/JCI116161.
34. Hänninen EL, Körfer A, Hadam M, Schneekloth C, Dallmann I, Menzel T, et al. Biological monitoring of low-dose interleukin 2 in humans: soluble interleukin 2 receptors, cytokines, and cell surface phenotypes. Cancer Res 1991; 51:6312-6; PMID:1933892.
35. Meropol NJ, Barresi GM, Fehniger TA, Hitt J, Franklin M, Caligiuri MA. Evaluation of natural killer cell expansion and activation in vivo with daily subcutaneous low-dose interleukin-2 plus periodic intermediate-dose pulsing. Cancer Immunol Immunother 1998; 46:318-26; PMID:9756416; http://dx.doi.org/10.1007/s002620050493.
36. Meropol NJ, Porter M, Blumenson LE, Lindemann MJ, Perez RP, Vaickus L, et al. Daily subcutaneous injection of low-dose interleukin 2 expands natural killer cells in vivo without significant toxicity. Clin Cancer Res 1996; 2:669-77; PMID:9816217.
37. Bernstein ZP, Porter MM, Gould M, Lipman B, Bluman EM, Stewart CC, et al. Prolonged administration of low-dose interleukin-2 in human immunodeficiency virus-associated malignancy results in selective expansion of innate immune effectors without significant clinical toxicity. Blood 1995; 86:3287-94; PMID:7579429.
38. Chen LL, Chen X, Choi H, Sang H, Chen LC, Zhang H, et al. Exploiting antitumor immunity to overcome relapse and improve remission duration. Cancer Immunol Immunother 2012; 61:1113-24; PMID:22198309; http://dx.doi.org/10.1007/s00262-011-1185-1.
39. Evans JH, Horowitz A, Mehrabi M, Wise EL, Pease JE, Riley EM, et al. A distinct subset of human NK cells expressing HLA-DR expand in response to IL-2 and can aid immune responses to BCG. Eur J Immunol 2011; 41:1924-33; PMID:21491418; http://dx.doi.org/10.1002/eji.201041180.
40. Lanier LL, Buck DW, Rhodes L, Ding A, Evans E, Barney C, et al. Interleukin 2 activation of natural killer cells rapidly induces the expression and phosphorylation of the Leu-23 activation antigen. J Exp Med 1988; 167:1572-85; PMID:3259252; http://dx.doi.org/10.1084/jem.167.5.1572.
41. Welner RS, Pelayo R, Garrett KP, Chen X, Perry SS, Sun XH, et al. Interferon-producing killer dendritic cells (IKDCs) arise via a unique differentiation pathway from primitive c-kitHiCD62L+ lymphoid progenitors. Blood 2007; 109:4825-931; PMID:17317852; http://dx.doi.org/10.1182/blood-2006-08-043810.
42. Guimont-Desrochers F, Boucher G, Dong Z, Dupuis M, Veillette A, Lesage S. Redefining interferon-producing killer dendritic cells as a novel intermediate in NK-cell differentiation. Blood 2012; 119:4349-57; PMID:22353997; http://dx.doi.org/10.1182/blood-2011-11-395954.
43. Chan CW, Crafton E, Fan HN, Flook J, Yoshimura K, Skarica M, et al. Interferon-producing killer dendritic cells provide a link between innate and adaptive immunity. Nat Med 2006; 12:207-13; PMID:16444266; http://dx.doi.org/10.1038/nm1352.

Article 3 : Immune infiltrates are prognostic factors in localized GIST

Dans cette partie seront présentés les principaux résultats d'une étude acceptée par *Cancer Research* : Rusakiewicz *et al*. **Immune prognostic and predictive factors in Gastrointestinal Sarcoma.**

Caractérisation de l'infiltrat GIST

Afin de caractériser les lymphocytes infiltrant les tumeurs stromales gastro-intestinales, nous avons dans un premier temps analysé les cellules NK, les LT et les Treg (en étudiant respectivement l'expression des marqueurs NKp46$^+$, CD3$^+$ et Fop3$^+$) sur une cohorte rétrospective de 57 patients atteints de GIST localisées et 10 patients atteints de GIST métastatiques (**Tableau 1**). Cette analyse immunohistologique montre que les tumeurs stromales gastro-intestinales présentent au diagnostic une infiltration en cellules NK, LT et Treg (**Figure 1A**). Cet infiltrat est identique que les tumeurs soient localisées ou métastatiques (**Figure 1A**). Dans les deux cas, on observe en effet une concentration des LT et Treg au niveau des foyers tumoraux alors que les cellules NK sont majoritairement présentes au niveau du stroma. Aucune corrélation n'est mise en évidence entre le nombre de cellules NK et LT ou NK et Treg (**Figures 1C** et **1D**).

Nous avons ensuite analysé l'infiltration tumorale des GIST localisées en fonction de facteurs pronostiques connus (score de Miettinen et mutation de l'exon 11 du gène KIT). Les patients présentant une mutation de l'exon 11 du gène KIT ou un score de Miettinen élevé sont en effet plus à risque de rechute. En l'absence de traitement, les NK infiltrant les GIST localisés sont trois fois moins abondants dans les tumeurs présentant une mutation de l'exon 11 du gène KIT ($p = 0,06$; **Figure 1E**) alors qu'aucune différence n'est mise en évidence pour les cellules CD3$^+$ ou FoxP3$^+$. De même, les GIST de bon pronostic selon le score de Miettinen (*Low/Intermediate risk*) sont enrichies en cellules NKp46$^+$ alors qu'elles présentent moins de cellules FoxP3$^+$ (**Figure 1F**).

Dans un deuxième temps et afin de caractériser les cellules NK infiltrant les GIST sur un plan fonctionnel, nous avons comparé par cytométrie de flux les populations de lymphocytes du sang et de tumeurs fraîchement extraites. Au total, quatorze GIST ont été étudiées (dont neuf au diagnostic et cinq ayant été préalablement traitées par IM). Six sarcomes des tissus mous (STS : *soft tissue sarcoma)* ont également été étudiés. Les caractéristiques démographiques des patients sont présentées **Tableau supplémentaire 1**. Les GIST ont une infiltration en leucocytes plus importante que dans les STS (20±6% des cellules vivantes versus 7±4%) avec en particulier un enrichissement en cellules NK au niveau

tumoral par rapport au sang périphérique (**Figures 2A**). Par contre, les GIST ne sont enrichies ni en LT $CD4^+$, ni en $CD8^+$, ni en Treg (définis comme étant $CD45^+CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$) (**Figure 2A**).

Les tumeurs GIST sont enrichies en cellules NK activées ; en effet, ces NK sont $CD56^{bright}$ expriment *ex vivo* le marqueur d'activation CD69 (**Figure 2B**) et sécrètent les cytokines IFN-γ et TNF-α après stimulation par PMA/ionomycine (**Figure 2C**). En comparaison, les cellules NK présentes dans le sang de patients atteints de GIST sont majoritairement $CD56^{dim}CD69^-$ et une stimulation par PMA/ionomycine n'induit pas de sécrétion d'IFN-γ ou de TNF-α (**Figures 2B** et **2C**). Dans les mêmes conditions, les $CD3^+$ présents au niveau tumoral sécrètent également des cytokines Th1 (**Figures 2D** et **2E**). Les NK infiltrant les GIST ont un phénotype homogène (peu de variabilité inter- ou intra-individuelle) et sont majoritairement $CD3^-CD56^{bright}CD94^+NKp80^+CD16^-NKG2A^-CD158^-$ (**Figures 2F** et **2G**) ; l'expression des marqueurs NKp30, CXCR3 et CX3CR1 est par contre variable (**Figure 2G**). Dans les STS, les cellules NK ne sont pas seulement rares mais majoritairement $CD3^-CD56^{dim}CD16^+$ et elles expriment faiblement CD94 et NKp80 (**Figure 2G**).

L'ensemble de ces données tend donc à montrer que dès le diagnostic, les GIST sont enrichies d'une part en cellules NK $CD56^{bright}$ activées qui se localisent principalement dans le stroma de la tumeur et qui sont dépourvues de récepteurs inhibiteurs ; et d'autre part en LT Th1 activés qui envahissent les foyers tumoraux.

Effets de l'IM sur l'infiltrat GIST

Nous avons ensuite étudié les effets de l'IM sur les paramètres immunitaires d'une cohorte de 24 GIST (dont 10 localisés et 14 métastatiques) traités par 400 mg d'IM en situation néo-adjuvante pendant une durée moyenne de 10.7 mois (**Figure 3**). Si l'IM ne modifie pas la densité de l'infiltration NKp46 au niveau du stroma, on observe une augmentation du nombre de cellules exprimant NKp46 au sein de la tumeur (**Figures 3A** et **3B**). Par contre, le traitement par IM ne modifie ni la densité ni la répartition des cellules $CD3^+$ (**Figure 3C**). Concernant les cellules $Foxp3^+$, on observe une diminution avec le traitement par IM (**Figure 3D**). Par conséquent, le ratio NKp46:Foxp3 est augmenté au niveau tumoral par un facteur quatre après traitement par IM.

L'activation des cellules NK étant dépendante des molécules de CMH-I, nous avons étudié par immunohistochimie l'expression de ces molécules sur un total de 42 tumeurs localisées (dont 32 non traitées et 10 traitées par IM en situation néoadjuvante). L'expression

des molécules de CMH-I au diagnostic est relativement homogène ; par contre, le traitement par IM s'accompagne d'une diminution de l'expression des molécules de CMH-I par les cellules tumorales (**Figure 4A**). De manière intéressante, l'infiltrat en LT est plus dense dans les tumeurs exprimant les molécules de CMH-I (**Figure 4B** et **4C**) ; l'infiltrat en cellules NK n'est par contre pas modifié par l'expression des molécules du CMH-I. Ces données sont corroborées en cytométrie de flux où les cellules tumorales ($CD45^-KIT^+CD34^+$) issues de GIST exposées *in vivo* à l'IM expriment moins les molécules de CMH-I alors qu'aucune différence n'est observée pour les molécules de CMH-II, HLA-E ou MICA/C (**Figure 4D**).

Cette diminution d'expression des molécules de CMH-I ne semble pas être liée à un effet direct de l'IM sur les cellules tumorales. *In vitro*, des cellules sensibles à l'effet de l'IM (lignées TF417 portant une mutation dans l'exon 11 de KIT) ou au contraire, résistantes à l'IM (lignées TF816 portant une mutation dans l'exon 17 de KIT) ont été incubées en présence d'IM et de cellules NK autologues (obtenues à partir de volontaires sains). Si on observe une diminution de MICA/B, aucune différence d'expression n'est observée pour les molécules de CMH-I et B7-H6 (**Figure 4E**). De même, les capacités de dégranulation et de sécrétion d'IFN-γ par les cellules NK sont identiques que les cellules soient sensibles ou résistantes à l'IM (**Figure 4F**).

En conclusion, un traitement par IM est associé à une diminution d'expression des molécules de CMH de classe I à la surface des cellules tumorales ainsi qu'à une augmentation de l'infiltration des cellules NK au sein de la tumeur.

NK, LT et pronostic des GIST localisées

Enfin, nous avons analysé l'impact de l'infiltration en cellules $NKp46^+$, $CD3^+$ ou $Fop3^+$ sur le pronostic de 53 patients atteints de GIST localisées dont 17 ont été traités en situation adjuvante par de l'IM. Les tumeurs ont donc été séparées en deux groupes selon qu'elles présentent plus ou moins de cellules que la médiane calculée sur l'ensemble des tumeurs. Alors que Foxp3 n'a pas de valeur pronostique sur cette cohorte de faible effectif (**Figure 5C**), les patients présentant des tumeurs enrichies en $NKp46^+$ et $CD3^+$ ont une survie sans rechute plus importante que ceux ayant des tumeurs faiblement infiltrées (**Figures 5A** et **5B**). Une analyse multivariée intégrant les paramètres cliniques pertinents indique que le score de Miettinen, l'infiltration en cellules $CD3^+$ et en cellules $NKp46^+$ sont des facteurs pronostiques indépendants pour la survie sans progression (Tableau 2). Par contre, ni le sexe, ni le statut mutationnel du gène KIT n'influence la survie sans progression. De plus, les patients pour lesquels les tumeurs sont faiblement envahies en cellules $CD3^+$ et en cellules

NKp46^{+} ont un risque de rechute beaucoup plus élevé que les patients dont la tumeur est infiltrée par au moins une de ces populations lymphocytaires (**Figure 5D**).

Nous avons ensuite analysé la densité des infiltrats immuns en fonction des facteurs pronostiques connus (mutation de l'exon 11 du gène KIT / score de Miettinen). L'impact des LT ou des NK ne semble pas être d'égale importance selon que la tumeur soit ou non mutée pour le gène KIT. En effet, pour les patients dont la tumeur est KIT^{wt}, un faible infiltrat en cellules NK est de très mauvais pronostic et ce, indépendamment du traitement par IM (**Figures 6A**). Par contre, pour les patients dont la tumeur est KIT^{exon11}, c'est l'infiltrat en LT qui influence le pronostic : le taux de rechute est plus important lorsque les tumeurs sont faiblement infiltrées en LT au diagnostic (**Figure 6B**).

Le score de Miettinen à lui seul permet de distinguer des patients à haut risque de rechute d'autres patients présentant peu voire pas de risque de rechute (**Figure 6C**). Par conséquent, les patients présentant un score de Miettinen de bas grade ne nécessitent pas de traitement supplémentaire. La décision d'un traitement pour les patients présentant un risque intermédiaire ou élevé est plus compliquée et encore largement débattue. Pour essayer de répondre à cette question, nous avons combiné le score de Miettinen à l'infiltrat immunitaire. De manière intéressante, l'infiltrat NKp46 permet de ségréger les patients avec un score de Miettinen élevé en deux groupes présentant des risques de progression significativement différents (**Figures 6D**). Les patients Miettinen^{high} NKp46^{high} ont un risque de rechute qui se rapproche de celui des patients présentant un score de Miettinen faible ou intermédiaire, et cela, indépendamment du traitement par IM puisque 5 des 9 patients n'ont pas reçu d'IM en adjuvant. Au contraire, les patients Miettinen^{high} NKp46^{low} rechutent très rapidement qu'ils soient traités par IM ou non (8 des 15 patients Miettinen^{high} NKp46^{low} ont été traités par IM). Le taux de CD3 permet également de séparer les patients présentant un score de Miettinen élevé en deux groupes de pronostic différents : les tumeurs faiblement infiltrées en CD3 sont de plus mauvais pronostic (**Figure 6E**). Par conséquent, dans les GIST localisées, l'infiltrat en cellules CD3^{+} ou NKp46^{+} peuvent être considérés comme des facteurs pronostiques indépendants pour la survie sans progression. Dans cette cohorte de GIST localisées, l'infiltrat immunitaire n'est par contre pas corrélé à une amélioration de la survie globale. Il semble cependant important de souligner qu'il s'agit d'une cohorte de faible effectif pour laquelle nous disposons d'un recul inférieur à 5 ans.

Immune infiltrates are prognostic factors in localized gastrointestinal stromal tumors.

Sylvie Rusakiewicz[1,2,3*], Michaela Semeraro[1,2,4*], Matthieu Sarabi[1,2], Mélanie Desbois[1,2,3], Clara Locher[1,2], Rosa Mendez[5], Nadège Vimond[1,2,3], Angel Concha[5,6], Federico Garrido[5,7], Nicolas Isambert[8,9], Loic Chaigneau[10], Valérie Le Brun-Ly[11], Patrice Dubreuil [12,13,14,15], Isabelle Cremer[16,17], Anne Caignard[18], Vichnou Poirier-Colame[1,2,3], Kariman Chaba[1,2], Caroline Flament[1,2,3], Niels Halama[19,20], Dirk Jäger[19,20], Alexander Eggermont[1], Sylvie Bonvalot[1,21,22,23], Frédéric Commo[1,24], Philippe Terrier[1,21,23,25], Paule Opolon[1,26,27], Jean-François Emile[28], Jean-Michel Coindre[29], Guido Kroemer[1,30-33], Nathalie Chaput[1,2,3], Axel Le Cesne[1,3,21], Jean-Yves Blay[34*] and Laurence Zitvogel[1,2,3,27*§].

[1] Institut Gustave Roussy (IGR), 114 rue Edouard Vaillant, 94805 Villejuif, France

[2] INSERM U1015, IGR, Villejuif, France

[3] Center of Clinical Investigations, CICBT507, IGR, Villejuif, France

[4] Department of Oncological Pediatrics, IGR, Villejuif, France

[5] Department of Clinical Analysis, Hospital Universitario Virgen de las Nieves (HUVN), Granada, Spain

[6] Department of Pathology and Tumor Tissue Biobank, HUVN, Granada, Spain

[7] Facultad de Medecina, Universidad de Granada, Granada, Spain

[8] Department of Medical Oncology, Centre Georges-François Leclerc, Dijon, France

[9] INSERM CIC-P 803, Dijon, France

[10] Department of Medical Oncology, Centre Hospitalier Universitaire Jean Minjoz, Besançon, France

[11] Department of Medical Oncology, Centre Hospitalier Universitaire Dupuytren, Limoges, France

[12] INSERM U891, Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, France

[13] Institut Paoli-Calmettes, 13009 Marseille, France

[14] Université de la Méditerranée, Marseille, France

[15] AB Science, 3 avenue George V, 75008 Paris, France

[16] INSERM U872, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France

[17] Université Pierre et Marie Curie, UMRS 872, Paris, France

[18] INSERM U1016, Institut Cochin, Paris, France

[19] Hamamatsu Tissue Imaging and Analysis Center (TIGA), BIOQUANT, Heidelberg, Germany

[20] National Center for Tumor Diseases, University Hospital Heidelberg, Heidelberg, Germany

[21] Department of Medicine, Sarcoma committee, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France

[22] Department of Surgery, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France

[23] Center of Biological Ressources, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France

[24] INSERM U981, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France

[25] Department of Pathology, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France

[26] Experimental Pathology Unit of IRCIV, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France

[27] Faculté de Médecine Paris Sud-Université Paris XI, France

[28] Department of Pathology, EA4340, Hôpital Ambroise Paré, Boulogne, France

[29] Department of Pathology, Institut Bergonié, Bordeaux, France

[30] INSERM, U848, Villejuif, France;

[31] Université Paris Descartes/Paris V, Sorbonne Paris Cité, Paris, France;

[32] Equipe 11 labelisée Ligue contre le Cancer, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France

[33] Pôle de Biologie, Hôpital Européen Georges Pompidou, AP-HP, Paris, France

[34] Department of Medicine, Centre Léon Bérard, Lyon, France

*Co-first and co-last authors equally contributed to this work.

§Corresponding author:

Pr Laurence ZITVOGEL

Institut Gustave Roussy

114 rue Edouard Vaillant

94805 VILLEJUIF Cedex

France

E-mail : zitvogel@igr.fr

Phone : +33 1 42 11 50 41

Fax : +33 1 42 11 60 94

Key words:

Cancer, GIST, NK cells, prognosis

Abbreviations :NK : Natural Killer Cells, GIST : Gastrointestinal sarcoma, STS : Soft Tissue Sarcoma, IM : Imatinib Mesylate, TIL : Tumor Infiltrating Lymphocytes, NKR :Natural Killer cells Receptor, NKp30/NCR3 : Natural Cytotoxicity Receptor p30, NKp46/NCR1 : Natural Cytotoxicity Receptor p46, KIR : Killer-cell Immunoglobulin like Receptor, MHC : Major Histocompatibility Chain, HLA : Histocompatibility Leukocyte Antigen, MICA/B :Major Histocompatibility Class I Chain-related gene A/B, IFNγ : Interferon gamma, TNFα : Tumor Necrosis Factor alpha, PMA : Phorbol myristate acetate, MFI : Mean Fluorescence Intensity, IHC : Immunohistochemistry, PFS : Progression Free Survival, AWD : Alive with Disease, NED : Non Evolutive Disease.

Acknowledgements :

We thank LIGUE labellisée, the Foundation ISREC, Lausanne and the Foundation « Ensemble contre le GIST », INCA, SIRIC Socrate and Fondation de France for supporting this work. SR and MS were supported by Ligue Nationale Contre le Cancer and Fondation pour la Recherche Médicale. Some materials and data used in this study were provided by the Conticagist tumor bank (https://www.conticagist.org/) with the support of Conticanet (FP6), EuroSarc (FP7-LSH 278742) and LYRIC (INCA_4664). RM was supported by Granada Research of Excellence Initiative on BioHealth (GREIB).

Abstract

Cancer immunosurveillance relies on effector/memory tumor infiltrating $CD8^+$T cells with a Th1 profile. Evidence for an NK cell-based control of human malignancies is still largely missing. The KIT tyrosine kinase inhibitor imatinib mesylate (IM) markedly prolongs the survival of patients with gastrointestinal stromal tumors (GIST) by direct effects on tumor cells, as well as by indirect immunostimulatory effects on T and NK cells. Here, we investigated the prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes expressing CD3, Foxp3 or NKp46 in a cohort of patients with localized GIST. We found that $CD3^+$ TIL were highly activated in GIST and were especially enriched in areas of the tumor that conserve class I MHC expression in spite of IM treatment. High densities of $CD3^+$ TIL predicted progression-free survival (PFS) in multivariate analyses. Moreover, GIST were infiltrated by a homogeneous subset of cytokine secreting -$CD56^{bright}$ NK cells that accumulated in tumor foci after IM treatment. The density of the NK infiltrate independently predicted PFS and added prognostic information to the Miettinen score, as well as to the KIT mutational status. NK and T lymphocytes preferentially distributed to distinct areas of tumor sections and probably contributed independently to GIST immunosurveillance. These findings encourage the prospective validation of immune biomarkers for optimal risk stratification of GIST patients.

Introduction

Gastrointestinal stromal tumors (GIST), the most frequent mesenchymal tumor of the digestive tract (10-20 annual cases/million), has become a paradigm for the development of personalized therapies against cancer(1) (2). Since 2001, GIST has served as a role model in the burgeoning field of molecularly defined therapies for solid malignancies. The combined discoveries of a biomarker, an oncogenic gain-of-function kinase mutation(3) and of a highly specific tyrosine kinase inhibitor (4), transformed the prognosis of this disease (5, 6).

Indeed, 70-80% of GIST harbor an oncogenic mutation in the type III receptor tyrosine kinase KIT, leading to ligand-independent receptor homodimerization and consequent kinase activation. The most common mutations of *KIT* (in two thirds of cases) are in-frame deletions, insertions, substitutions or combinations thereof, affecting the juxtamembrane domain encoded by exon 11. In particular, deletions involving codon 557/558 are associated with a shorter event-free and overall survival (7). Among the GIST bearing wild type KIT, 5-8% exhibit activating mutations of PDGFRA affecting its juxtamembrane domain (encoded by exon 12), the ATP-binding domain (encoded by exon 14) or the activation loop (encoded by exon 18) (8). GIST lacking either *KIT* or *PDGFRA* mutations called "wild type GIST" are heterogeneous and harbor mutations in *NF1*, *BRAF*, *RAS* or genes encoding subunits of the succinate dehydrogenase complex (9).

The tyrosine kinase inhibitor imatinib mesylate (IM) was first administered to a GIST-bearing patient in 2001 (5). IM inhibits KIT by directly binding to the ATP-binding site

within the N-terminal lobe of the kinase, stabilizing the kinase in its inactive conformation (10). To date, the median survival of patients with advanced GIST treated with first line IM is 5 years and 34% of the patients survive more than 9 years (11, 12). In addition, adjuvant IM decreases the risk of relapse after resection of a localized GIST (6). However, even long-term IM treatment fails to eradicate GIST cells in both advanced and localized adjuvant settings, perhaps because IM has mostly cytostatic effects or because GIST stem cells do not require KIT signaling for their survival (13). Moreover, continuous IM exposure can lead to the selection IM-resistant tumor cells with secondary *KIT* mutations (14). An important research goal is to develop new inhibitors interfering with secondary activation loop mutations or targeting new metabolic pathways relevant for distinct subtypes of GIST (such as SDH-deficient tumors).

Another potential strategy consists in mobilizing the immune system against GIST during/after IM therapy. Indeed, immunostimulatory bystander or off-target effects of distinct cytotoxic compounds reportedly contribute to their anticancer effects (15). We found that IM can promote a KIT-dependent crosstalk between dendritic and NK cells, leading to IFNγ production by NK lymphocytes, both in mice and in humans (16). Importantly, in advanced GIST, NK cell activation following 2 months of IM treatment constituted a favorable independent predictive factor (17). Moreover, alternative splicing of exon 4 of the *NKp30* gene affecting the signaling of the NK-specific NKp30 protein determined the prognosis of metastatic GIST patients treated with IM (18). Beyond NK cells, T cells may influence the course of GIST. Balachandran et al. reported the discovery that, in mouse GIST models, the antitumor effects of IM relied on the contribution of $CD8^+$ T lymphocytes (19). Thus, inhibition of oncogenic KIT by IM in tumor cells could shut down

the expression of indoleamine 2, 3 –dioxygenase (IDO), thereby promoting the apoptosis of regulatory Foxp3$^+$ T cells and permitting the activation of tumor infiltrating effector lymphocytes (19).

Very few studies have addressed the immune infiltrate of GIST (20, 21). Using systematic immunohistochemistry (IHC) and flow cytometric analyses, we discovered that primary GIST are infiltrated by activated NK cells and CD3$^+$ T cells. However, the two lymphocytes subsets were not localized in the same tumor areas and influenced progression free-survival independently from currently used prognostic parameters (Miettinen score or *KIT* mutations) in multivariate analyses.

Results

NK cell infiltrates in GIST

We performed a retrospective immunohistochemical analysis of a cohort of 57 localized and 10 metastatic GIST at diagnosis (IM-free, Table 1) using antibodies directed against CD3, Foxp3 and NKp46 aimed at identifying T lymphocytes, regulatory T (Treg) cells and NK cells respectively. The NKp46 specific staining resided in fibrous trabeculae (Fig. 1A, left panel, Fig. 1B), while CD3 and Foxp3 positive cells were mostly localized in tumor foci (Fig. 1A, middle and right panels). The primary tumor of metastatic GIST exhibited similar patterns of tumor infiltrating lymphocytes (TILs) (Fig. 1A). There was no significant correlation between the numbers of T, Tregs and NK cells (Fig. 1C, Fig. 1D). In the absence of IM therapy, harboring a KIT exon 11 mutation or a high Miettinen score is associated

with dismal prognosis (22). In localized GIST, NK TILs were three times less frequent in GIST bearing a KIT exon 11 mutation than in wild type (WT) GIST (Fig. 1E, left panel, median of 6 versus 21/field respectively, p=0.06). In addition, localized GIST with low/intermediate Miettinen risk were enriched in NKp46$^+$ (but not CD3$^+$) cells and lacked Foxp3$^+$ cells at diagnosis compared with high Miettinen risk GIST (Fig. 1F, left panel, p=0.04, and right panel, p=0.01, respectively). When dissecting the 3-digit Miettinen score, we identified NKp46$^+$ cells to be significantly associated with a low mitotic index and a stomach localization (Supplemental Fig. 1A-B, left panels, p=0.04 and p=0.01 respectively), while the frequency of CD3$^+$ cells inversely correlated with tumor size (Supplemental Fig. 1C, middle and right panels).

To investigate the functional phenotype of NK TILs, we performed a comprehensive flow cytometry analysis of NK cells purified from 14 freshly harvested and dissociated localized GIST tumors (9 at diagnosis and 5 post-IM), comparing them to autologous circulating NK cells or to NK cells purified from 6 soft tissue sarcomas (STS) (Supplemental Table 1). GIST contained denser leukocytic infiltrates than STS (20%±6% of live cells versus 7%±4%) with a marked enrichment in NK cells in the tumor compared with blood (Fig. 2A). Interestingly, in contrast to T cell-edited cancers, GIST did not promote the intratumoral trafficking of CD8$^+$ T lymphocytes since most TILs were CD4$^+$ T cells (Fig. 2A, Supplemental Fig. 2). The proportion of CD3$^+$CD4$^+$CD25^{high}CD127$^-$ regulatory T cells was not enhanced in TILs compared with blood (Fig. 2A, Supplemental Fig. 2). GIST NK TILs expressed the activation marker CD69 *ex vivo* (Fig. 2B) and produced IFNγ (and to a lesser extent TNFα) after a brief (2 hours) restimulation with PMA/ionomycine (Fig. 2C). CD3$^+$TILs also produced Th1 cytokines in similar conditions (Fig. 2D-E). The phenotype of NK TILs in GIST

was homogeneous with little interindividual or intraindividual (pre- versus post-IM) variations since most GIST NK TIL were $CD3^{-}CD56^{bright}$ $CD94^{+}NKp80^{+}CD16^{-}NKG2A^{-}CD158^{-}$ (Fig. 2F-G) (but expressed variable levels of NKp30/CXCR3/CX3CR1) cells (Fig. 2G). In STS, NK TILs were not only rare but also $CD3^{-}CD56^{dim}$ $CD16^{+}$ and low in the expression of CD94 and NKp80 (Fig. 2G).

Altogether, GIST differ from other sarcomas in thus far that their TIL are enriched in activated $CD56^{bright}$ NK cells that are devoid of inhibitory receptors and are localized at the tumor borders. Moreover, GIST TILs contained activated Th1 cells invading tumor foci.

Imatinib therapy is associated with MHC class I loss variants and NK cell penetration into tumor foci

We next analyzed the effects of IM therapy on GIST TIL. Patients received 400 mg IM daily for an average time of 10.7 months. While the density of NKp46 infiltrates did not change in fibrous trabeculae (Fig. 3A-B), the frequency of $NKp46^{+}$ cells infiltrating the core of localized or metastatic GIST increased after IM treatment (Fig. 3B, right panel, p=0.004 for localized and p=0.001 for metastatic GIST). In contrast, $Foxp3^{+}$ cells significantly decreased while $CD3^{+}$ cell numbers did not change (Fig. 3C-D). Hence, the ratio NKp46/Foxp3 in the tumor nests markedly rose by four fold after IM.

Since both T and NK cell education and activation are dictated by MHC class I molecules, we performed immunohistochemical analyses of a total of 42 localized GIST (surgery alone or followed by adjuvant IM, n=32; neoadjuvant IM followed by surgery, n=10) using the EMR8.5 antibody specific for a non-polymorphic epitope of the heavy chain of MHC class I molecules. While most GIST at diagnosis homogeneously express MHC class I molecules, up

to 30% GIST fully lost MHC class I expression upon IM and 40% GIST became partially (in areas) MHC class I negative (Fig. 4A, p=0.008). Importantly, T cells tended to accumulate in MHC class I positive tumors (Fig. 4B, left panel, p=0.03) and areas (Fig. 4C), but disappeared from MHC class I negative tumors or areas (Fig. 4B, left panel, Fig. 4C). In contrast, NK cells were not enriched in MHC class I negative tumors or areas (Fig. 4B, right panel). The immunohistochemical results were corroborated by flow cytometry gating on $CD45^{-}KIT^{+}CD34^{+}$ cells in 9 GIST at diagnosis and 5 GIST after *in vivo* exposure to IM. The level of expression of MHC class I molecules was higher in GIST at diagnosis compared with GIST treated with neoadjuvant IM (mean ratio MFI staining/MFI isotype control: 11 ± 4 versus 2 ± 1 respectively, Fig. 4D, p=0.042) while no significant difference was observed for MHC class II, HLA-E or MICA/B expression (Fig. 4D). When analyzing the clinical outcome of the 10 neoadjuvant GIST patients enrolled in this study, we found MHC class I loss variants in all (4/4) patients that were disease-free at 7 years post-diagnsosis, while only half of the paients (3/6) relapsing or dying of their disease manifested loss of MHC class I expression.

The reduction of MHC class I expression by GIST tumors did not result from direct oncogene inhibition by IM. We took advantage of IM-sensitive (TF417 cells bearing an *exon 11 Kit* mutation) and IM-resistant (TF816 cells with an *exon 17 kit* mutation) KIT transduced erythroleukemic cells (23) that we incubated in the presence of IM and allogeneic NK cells (from normal volunteers). IM significantly decreased cell surface expression of MICA/B but did not affect MHC class I or B7-H6 expression (Fig. 4E). No correlation between the susceptibility of the target to IM and the NK cell effector functions could be observed (Fig. 4F).

We conclude that long-term treatment with IM is associated with a progressive loss of MHC class I molecules on GIST cells, as well as with an increase of NK cells infiltration into the core of the tumor.

NK cell infiltrates and prognosis of localized GIST

We analyzed the prognostic impact of the NKp46^{+}, CD3^{+} and Foxp3^{+} cell counts in tissue sections at diagnosis (using the median scores defined in Fig. 1) of 53 localized GIST that were treated (n=17) or not (n=36) with IM in adjuvant setting. NK and CD3 cell infiltrates were both associated with a reduced relapse rate (Fig. 5A-B, p=0.001 and p=0.007 respectively) while the Foxp3 score did not influence GIST patients' clinical outcome (Fig. 5C). Multivariate analyses (with a median follow-up of 51 months) of all relevant clinical parameters available revealed that the Miettinen score, the frequency of CD3 cells (Hazard Ratio=2.26, p=0.05) and the NKp46 scores (Hazard Ratio=0.2, p=0.01) were independent prognostic factors for progression-free survival (PFS) (Table 2). Neither gender nor the mutational status of KIT did significantly influence PFS. Combining NK and T cell scores allowed for the identification of a subgroup of 24% of patients that were NKp46^{low}CD3^{low} and had a dismal prognosis (Fig. 5D, p=0.0005).

Stratification of GIST patients based on the oncogenic KIT mutation and the NKp46 score identified a subset of 10% of patients that were KIT^{wt} NKp46^{low} (33% of all KIT WT GIST) with a particularly high relapse rate regardless of IM adjuvant therapy (Fig. 6A p=0.006). Moreover, stratification of GIST patients based on the oncogenic KIT mutation and the CD3 score identified a subset of 33% of patients that were KIT^{exon11} CD3^{low} (44% of all exon 11 mutated GIST) with a particularly high relapse rate regardless of IM adjuvant therapy (Fig.

6B, p=0.03). As expected (22), the Miettinen score alone has an impact on survival with a 5 year median of PFS for patients bearing a high score, while PFS was unreached for GIST patients with Miettinen $^{low/intermediate}$ score (Fig. 6C, p=0.006). Combining both Miettinen and NKp46 parameters identified a subgroup of patients (about one half of Miettinen^{high} GIST patients) presenting with a Miettinen^{high} NKp46^{high} score and a reduced relapse rate, similar to patients with Miettinen$^{low/intermediate}$ scores (Fig. 6D, p<0.0001), regardless of IM-adjuvant therapy (given that 7/11 patients underwent surgery only). In contrast, GIST patients with a Miettinen^{high} and NKp46^{low} score exhibited a short PFS (0.91 year versus 5 years for high Miettinen score alone, Fig. 6D), independently of adjuvant-IM therapy (given that 53% of Miettinen^{high} NKp46^{low} underwent surgery followed by adjuvant IM therapy). The CD3 score also affected the fate of high Miettinen^{high} GIST in thus far that a subset of 22% GIST (harboring a Miettinen^{high} CD3^{low} score) had a dismal prognosis (Fig. 6E, p<0.0001). Thus, in localized GIST, both the CD3^{+} and NKp46^{+} infiltrates can be considered as independent prognostic factors that add relevant information to the classical Miettinen score with regard to the PFS. Overall survival was also analyzed (Table 2). Given the limited follow up and the size of the cohort, no significant correlation with immune infiltrates was observed.

Discussion

This report represents, to our knowledge, the first description of a tumor type that appears to be controlled by a natural immunosurveillance system that involved both T and NK cells. We found that imatinib promotes the reduction of MHC class I expression by tumor cells (which theoretically may reflect a T cell-based immunoediting process) and a relocation of

NK cells to the core of the tumor. Finally, NK and T cell infiltrates were both independently associated with PFS and may cooperate in addition with tumor cell-intrinsic parameters (featured by the Miettinen score) to influence the clinical outcome of GIST.

Since the pioneering observation describing an inverse correlation between NK cell cytotoxicity and cancer incidence (24), many independent groups reported that intratumoral NK cell infiltrates in solid tumors are rare, anergic or irrelevant. Using tumor tissue microarrays (TMA), Sconocchia et al. found that 71% of melanomas, 97% of breast cancers, 92% of renal cell carcinoma and 92% of hepatocellular carcinomas contained no $CD56^{+}$ cell infiltrate, and similar results were obtained using anti-NKp46 or anti-CD57 antibodies (25). Slinfluff's corroborated these data showing that metastatic melanoma are devoid of NK cells and are rather infiltrated by T and B cells (26). Cremer's group carefully studied the profile of NK TILs in early-stage non-small cell lung cancers. Few NK cells were observed in the invasive margin, mostly $CD56^{dim}$ that exhibited reduced levels of activating receptors (NKp30, NKp80, CD16, DNAM-1) and a decreased degranulation and cytokine secretion (27). These findings were in accordance with other observations in similar cancer types even though in some instances, NK cells were enriched in $CD56^{bright}$ cells (28, 29). In HPV-related tumors, such as cervix carcinoma and high-grade squamous intraepithelial lesions, loss of NCR expression on NK cells correlated with their weak cytotoxicity, HPV-16 infection and advanced clinical stage (30). Even in breast cancers that are prone to be controlled by NK cells (31) and contain NK TILs enriched in $CD56^{bright}$ cells, NK TILs exhibited low expression of NCR and defective functions (ADCC, cytokine release, degranulation) that inversely correlated with the Nottingham prognostic index and upregulated NKG2A inhibitory receptors (32). In contrast, in kidney cancers, high NK TIL

content was associated with high CD16 expression on NK cells but low cytotoxic function after ex vivo reactivation using IL-2 or NKp46 stimulation (33). More importantly, the presence of intratumoral NK cells was not associated with clinical outcome at early stages of lung (27) and colon (25) cancers.

So, what might be the reason why GIST fail to tolerize NK cells? Chronic NKR ligand stimulation by tumor cells may account for the down regulation of DNAM1 or NKG2D on NK cells and perturbed NK TIL functions, as this has been shown for breast and ovarian cancers (32, 33). GIST cells failed to express most of the NKR ligands at diagnosis (Fig. 4D), which may explain that NK cells conserve high expression of NKR. Moreover, our high content multiplex cytokine/chemokine array analysis on fresh GIST (not shown) confirmed the local secretion of stem cell factor (SCF) and stem cell growth factor (SCGF) (34, 35), which both could contribute to *in situ* homeostasis or differentiation of NK TILs.

Does oncogene inhibition (through IM) contribute to strengthening NK cell immunosurveillance against GIST? Even though IM treatment leads to MHC class I loss *in vivo*, it is unlikely that the IM effects are cell-autonomous and result in enhanced target cell recognition by NK TILs, for several reasons. First, WT KIT GIST are particularly enriched in NK cells (Fig. 1E). Second, incubation of IM-sensitive versus IM-resistant KIT transduced tumor cells in the presence of IM did not reveal the capacity of IM to modulate degranulation or cytokine release (Fig. 4F). However, as for p53-dependent senescence (36), KIT inactivation by IM may modulate chemokine release, specifically during the dialogue between NK cells and KIT-expressing tumor cells. Of note, the Cxcl9 and Cxcl10 gradients were inversed by IM treatment from an initial preference for the peripheral stroma to a later preference for the tumor core (SR, unpublished data), and this may

contribute to the intratumoral homing of NK TILs. Moreover, KIT inhibition might reduce IDO concentrations, thereby reversing the intratumoral accumulation of $Foxp3^+$ cells [(19) and Fig. 3D] and hence unleash NK cell effector functions (37).

Which immune biomarker does prevail as a prognostic biomarker in the course of GIST treated with first-line IM therapy? In contrast to soft tissue sarcoma, GIST are heavily infiltrated by leukocytes composed of all three subsets (CD4, CD8, NK) and relatively low numbers of $Foxp3^+$ $CD4^+$ T cells (Fig. 2A, supplemental Fig.2 and (19)). NK TIL accumulation may, at least in part, be driven through cell-autonomous features, given its significant association with the Miettinen score (gastric localization and low mitotic index, Fig. 1F, left panel and supplemental Fig. 1) and the WT status of *KIT* gene (Fig. 1E, left panel). Nevertheless, NK cell infiltrates represent an independent prognostic factor that adds prognostic information to the Miettinen score for optimally resected primary GIST (Fig. 5-6). NKp30 is the only NKR to be down modulated on local and circulating NK cells, and the expression of functionally distinct NKp30 isoforms dictates PFS after IM therapy (18). In addition, T cells appear to play a major role in the immunosurveillance of GIST harboring exon 11 mutations. The Foxp3 infiltrates (as measured in IHC) were positively correlated with the high-risk Miettinen score (Fig 1F, right panel) and to a lesser extent with the mutational status (exon 11 mutations of KIT) (Fig 1E, right panel). The Foxp3 infiltrates strongly decreased post-IM (Fig. 3D). $Foxp3^+$ cells were as frequent in primary as in metastatic lesions (Fig. 1A, right panel and 3D). These data are in accordance with Balachandran et al (19) showing that IM treatment (mainly in GIST harbouring KIT exon 11 mutations) was accompanied by Treg apoptosis secondary to the reduction of IDO. When we analyzed the prognostic value of Foxp3 infiltrates in our cohort, we found that

intratumoral Treg numbers were not associated with PFS in primary GIST. However, when stratifying the patients according to the absence or presence of adjuvant IM treatment post-surgery, we found that the accumulation of Foxp3$^+$ cells and the loss of NKp46$^+$ cells were both negative predictors of IM responses but were not prognostic markers (not shown). Further investigations on larger cohorts will be required to validate these data. Given that CD3$^+$ T cell infiltrates represent an independent prognostic marker for PFS in localized GIST, it is tempting to speculate that they may shape the tumor microenvironment at early stages (Fig. 1, Supplemental Fig. 1, Fig.5, Fig. 6 and Table 2). Given that both T and NK subsets did not colocalize within the same areas of the tumor (Fig. 1A-B and Fig.3B-C), did not correlate in the frequency with each other (Fig. 1C) and added prognostic values to different mutations (Fig. 5-6), we postulate that they should be considered as cooperating, yet independent factors that both influence the clinical outcome of localized GIST.

What are the current recommendations for assessing the risk of relapse after resection of a primary localized GIST? They are based on five parameters: tumor size, tumor location, mitotic index (22), mutational status of GIST (38), and more recently tumor rupture during surgery (39). However, new predictors are currently being investigated, taking into account the accumulation of chromosomal aberrations (40-42), the inactivation of the tumor suppressor gene CDKN2A, the co-deletion of the gene coding for the methylthio-adenosine phosphorylase and the downregulation of the cell cycle inhibitor p27 (43-45). Prospective studies must evaluate the predictive role of T and NK cell infiltrates and to correlate them with the aforementioned intrinsic features of GIST. Based on the results obtained in this limited series of patients, we anticipate that the accurate quantification of the density and function of distinct lymphocyte subsets will refine current

methods of risk stratification in GIST and hence possibly guide therapeutic decisions, including those affecting present and future immunotherapies.

METHODS

Patients and specimens. The immunohistochemical study was carried out on a total of 91 paraffin-embedded GIST specimen (67 from the localized GIST cohort (57 No IM; 10 post IM) and 24 from the metastatic GIST cohort (10 no IM; 14 post IM)). Patients' characteristics are depicted in **Table 1.** The immunomonitoring studies on fresh tumors were prospectively performed on 14 GIST patients (9 at diagnosis and 5 post-IM) and 6 Soft Tissue Sarcoma (STS) patients enrolled for surgery (Supplemental **Table 2**). Patients' samples were provided by the Gustave Roussy Institute (Villejuif, France), the University Hospital Virgen de las Nieves (Granada, Spain), the Léon Bérard Centre (Lyon, France), the Bergonié Institute (Bordeaux, France), the University Hospital Jean Minjoz (Besançon, France) and the University Hospital Dupuytren (Limoges, France). An informed written consent was obtained from patients according to the local ethical committee. Heparinized blood was drawn from patients before surgery for the immunomonitoring study. Clinical responses were assessed by computed tomography (CT) scan and the responses were classified according to the RECIST criteria.

Study Approval. Study with GIST and STS specimen were approved by the local Ethic Committee (2007-A00923-50) with written informed consent received from patients.

GIST tumor dissociation and flow cytometry. Fresh tumors were dissociated within 12h post-surgery following the gentle MACS Dissociator protocol (Miltenyi). Briefly, resected tumors were cut into small pieces, placed in tube C with the dissociation buffer (RPMI 1640, 100U Pen/Strep, 50U/mL Collagenase IV, 30U/mL DNAse, 280U/mL hyaluronidase) and processed with the h_tumor_01 program on the gentle MACS dissociator. The resulting cell suspension was filtered through a 70 μ m cell strainer (BD Biosciences), washed in PBS and cell viability was estimated by Hayem Blue. Tumor cell suspensions were analyzed by 12-color flow cytometry and NK cells were defined as CD45+CD3-CD56+ and tumor cells as CD45-CD34+KIT+. The NK receptor and tumor ligand antibodies included in this study are listed in **Supplementary Table 2**. Cells were incubated with conjugated antibodies for 20 minutes at 4°C, washed and fixed with 1% paraformaldehyde.

For intracellular cytokine staining, patients' PBMC and TILs were seeded in 96-round bottom plates at $1x10^5$ cells/well in RPMI + 10% AB serum with PMA/Iono (10ng/mL and 250ng/mL respectively, Calbiochem) plus Golgi Stop (4uL/6mL, BD Bioscience) for 2 hours at 37°C. Cells were fixed and permeabilized with Fix/Perm reagents (eBioscience) following manufacturer's protocol. Stained cells were acquired within 24 hours on Cyan Flow cytometer (Beckman Coulter) and analyzed using FlowJo software (Tree Star).

Immunohistochemistry (IHC) staining. Paraffin–embedded GIST specimen were assessed for the infiltration by NK, CD3, CD8, $Foxp3^+$ cells and HLA class I positivity (EMR8-5) with the antibodies listed in **Supplementary Table 2**. Briefly, 3µm–thick sections of formalin-fixed, paraffin–embedded GIST specimen were mounted on poly–L–lysine-coated slides, deparaffinized for antigen retrieval and then rehydrated through graded alcohols to water.

Retrieval buffers consisted in Tris–EDTA buffer (10mM Tris, 1mM EDTA) pH9 for NKp46, pH8 for CD8 staining; 0.01M citrate buffer pH10 for Foxp3 and pH7 for EMR8-5. Slides were incubated for 30 minutes in a 98 °C water bath. Endogenous peroxidase activity was inhibited with 3% hydrogen peroxidase (DAKO) for 10 minutes and non-specific protein were blocked for 15 minutes (Protein block, DAKO). The primary antibody was incubated for 1 hour, followed by the secondary Ab, polymer-peroxidase for mouse (NKp46, EMR8-5), or rabbit (CD3, CD8) monoclonal Ab (EnVision™System, DAKO) or Novolink (NOVOCASTRA) for Foxp3, incubated for 45 minutes. Peroxidases were detected with 3–amino–9–ethylcarbazole substrate (AEC, Vector Laboratories) for NKp46 and CD8 or with Di Amino Benzidine-peroxidase substrate kit (DAKO) and the sections were counterstained with Harris's hematoxylin and dehydrated except for AEC substrate (NKp46 and CD8) where the slides were mounted using Glycergel (DAKO). Negative controls were made by substituting primary Ab with isotype controls. CD3 staining was performed on fully automated Ventana Benchmark XT system (Roche Ventana) following manufacturers' recommendations. Positive cells were counted in 10 random x200 fields in a double-blinded fashion. For CD3 staining, slides were digitized with a slide scanner (Nikon Supercoolscan 8000 ED) and processed with Pix Cyt software enabling whole slide quantification (46).

NK/tumor cross- talk in vitro. TF-1 erythroleukemic cell line engineered to express human KIT gene either resistant (hKIT D816V or TF816, exon 17) or sensible (hKIT Δ 417/8+D419Y or TF417, exon 11) to IM (kindly provided by Dr Dubreuil, Marseille, France) (23) were cultivated in RPMI supplemented with 10% fetal calf serum (FCS, PAA), 1%

Pen/Strep and 2mM Glutamine. $5x10^5$ tumor cell lines (TF417, TF816 and GIST 888) were seeded in 24 well plate overnight. The following day, IM (10^{-6}M) was added or not and cells were incubated for 24 hours. Tumor cell viability was assessed by Annexin V/PI staining and the expression of NK cell ligands was monitored with the antibodies listed in **Supplemental Table 2**. In some experiments, IM-treated tumor cell lines (TF417 and TF816) were incubated with healthy volunteers' enriched NK cells (Easy Sep kit, Stem cell Technologies) at a ratio 1 :5 to monitor CD107a membrane expression by flow cytometry, following 5 hours' incubation with 2 µl of anti-CD107a-PE and 10 µM Golgi Stop (BD Biosciences) as well as IFNγ production by commercial ELISA (BD Biosciences) following 24 hours incubation.

Statistical analyses. The Fisher's exact test, the Chi-square test, the linear regression test and the parametric Wilcoxon test and the non-parametric Mann-Whitney test were used for comparison of the different groups. These statistical analyses were performed with the GraphPad Prism software version 5. The survival curves were plotted according to the Kaplan-Meier method, and compared using the log-rank (Mantel Cox). Multivariate analyses were performed with Spss 17.0 (IBM SPSS, Paris, France), using the Cox model.

Reference

1. Nilsson B, Bumming P, Meis-Kindblom JM, et al. Gastrointestinal stromal tumors: the incidence, prevalence, clinical course, and prognostication in the preimatinib mesylate era--a population-based study in western Sweden. Cancer 2005; 103: 821-9.
2. Dematteo RP, Heinrich MC, El-Rifai WM, Demetri G. Clinical management of gastrointestinal stromal tumors: before and after STI-571. Hum Pathol 2002; 33: 466-77.

3. Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, et al. Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. Science 1998; 279: 577-80.
4. Tuveson DA, Willis NA, Jacks T, et al. STI571 inactivation of the gastrointestinal stromal tumor c-KIT oncoprotein: biological and clinical implications. Oncogene 2001; 20: 5054-8.
5. Joensuu H, Roberts PJ, Sarlomo-Rikala M, et al. Effect of the tyrosine kinase inhibitor STI571 in a patient with a metastatic gastrointestinal stromal tumor. N Engl J Med 2001; 344: 1052-6.
6. Dematteo RP, Ballman KV, Antonescu CR, et al. Adjuvant imatinib mesylate after resection of localised, primary gastrointestinal stromal tumour: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. Lancet 2009; 373: 1097-104.
7. Andersson J, Bumming P, Meis-Kindblom JM, et al. Gastrointestinal stromal tumors with KIT exon 11 deletions are associated with poor prognosis. Gastroenterology 2006; 130: 1573-81.
8. Heinrich MC, Corless CL, Duensing A, et al. PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. Science 2003; 299: 708-10.
9. Janeway KA, Kim SY, Lodish M, et al. Defects in succinate dehydrogenase in gastrointestinal stromal tumors lacking KIT and PDGFRA mutations. Proc Natl Acad Sci U S A 2010; 108: 314-8.
10. Mol CD, Dougan DR, Schneider TR, et al. Structural basis for the autoinhibition and STI-571 inhibition of c-Kit tyrosine kinase. J Biol Chem 2004; 279: 31655-63.
11. Demetri GD, von Mehren M, Blanke CD, et al. Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. N Engl J Med 2002; 347: 472-80.
12. Le Cesne A, Ray-Coquard I, Bui BN, et al. Discontinuation of imatinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumours after 3 years of treatment: an open-label multicentre randomised phase 3 trial. Lancet Oncol 2010; 11: 942-9.
13. Bardsley MR, Horvath VJ, Asuzu DT, et al. Kitlow stem cells cause resistance to Kit/platelet-derived growth factor alpha inhibitors in murine gastrointestinal stromal tumors. Gastroenterology 2010; 139: 942-52.
14. Pierotti MA, Tamborini E, Negri T, Pricl S, Pilotti S. Targeted therapy in GIST: in silico modeling for prediction of resistance. Nat Rev Clin Oncol 2011; 8: 161-70.
15. Zitvogel L, Kepp O, Kroemer G. Immune parameters affecting the efficacy of chemotherapeutic regimens. Nat Rev Clin Oncol 2011; 8: 151-60.
16. Borg C, Terme M, Taieb J, et al. Novel mode of action of c-kit tyrosine kinase inhibitors leading to NK cell-dependent antitumor effects. J Clin Invest 2004; 114: 379-88.
17. Menard C, Blay JY, Borg C, et al. Natural killer cell IFN-gamma levels predict long-term survival with imatinib mesylate therapy in gastrointestinal stromal tumor-bearing patients. Cancer Res 2009; 69: 3563-9.
18. Delahaye NF, Rusakiewicz S, Martins I, et al. Alternatively spliced NKp30 isoforms affect the prognosis of gastrointestinal stromal tumors. Nat Med 2011; 17: 700-7.
19. Balachandran VP, Cavnar MJ, Zeng S, et al. Imatinib potentiates antitumor T cell responses in gastrointestinal stromal tumor through the inhibition of Ido. Nat Med 2011; 17: 1094-100.
20. Cameron S, Haller F, Dudas J, et al. Immune cells in primary gastrointestinal stromal tumors. Eur J Gastroenterol Hepatol 2008; 20: 327-34.

21. van Dongen M, Savage ND, Jordanova ES, et al. Anti-inflammatory M2 type macrophages characterize metastasized and tyrosine kinase inhibitor-treated gastrointestinal stromal tumors. Int J Cancer 2009; 127: 899-909.
22. Miettinen M, Sobin LH, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors of the stomach: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 1765 cases with long-term follow-up. Am J Surg Pathol 2005; 29: 52-68.
23. Voisset E, Lopez S, Dubreuil P, De Sepulveda P. The tyrosine kinase FES is an essential effector of KITD816V proliferation signal. Blood 2007; 110: 2593-9.
24. Imai K, Matsuyama S, Miyake S, Suga K, Nakachi K. Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. Lancet 2000; 356: 1795-9.
25. Sconocchia G, Zlobec I, Lugli A, et al. Tumor infiltration by FcgammaRIII (CD16)+ myeloid cells is associated with improved survival in patients with colorectal carcinoma. Int J Cancer 2010; 128: 2663-72.
26. Erdag G, Schaefer JT, Smolkin ME, et al. Immunotype and immunohistologic characteristics of tumor-infiltrating immune cells are associated with clinical outcome in metastatic melanoma. Cancer Res 2012; 72: 1070-80.
27. Platonova S, Cherfils-Vicini J, Damotte D, et al. Profound coordinated alterations of intratumoral NK cell phenotype and function in lung carcinoma. Cancer Res 2011; 71: 5412-22.
28. Carrega P, Morandi B, Costa R, et al. Natural killer cells infiltrating human nonsmall-cell lung cancer are enriched in CD56 bright CD16(-) cells and display an impaired capability to kill tumor cells. Cancer 2008; 112: 863-75.
29. Le Maux Chansac B, Moretta A, Vergnon I, et al. NK cells infiltrating a MHC class I-deficient lung adenocarcinoma display impaired cytotoxic activity toward autologous tumor cells associated with altered NK cell-triggering receptors. J Immunol 2005; 175: 5790-8.
30. Garcia-Iglesias T, Del Toro-Arreola A, Albarran-Somoza B, et al. Low NKp30, NKp46 and NKG2D expression and reduced cytotoxic activity on NK cells in cervical cancer and precursor lesions. BMC Cancer 2009; 9: 186.
31. Dewan MZ, Terunuma H, Takada M, et al. Role of natural killer cells in hormone-independent rapid tumor formation and spontaneous metastasis of breast cancer cells in vivo. Breast Cancer Res Treat 2007; 104: 267-75.
32. Mamessier E, Sylvain A, Bertucci F, et al. Human breast tumor cells induce self-tolerance mechanisms to avoid NKG2D-mediated and DNAM-mediated NK cell recognition. Cancer Res 2011; 71: 6621-32.
33. Schleypen JS, Baur N, Kammerer R, et al. Cytotoxic markers and frequency predict functional capacity of natural killer cells infiltrating renal cell carcinoma. Clin Cancer Res 2006; 12: 718-25.
34. Da Riva L, Bozzi F, Mondellini P, et al. Proteomic detection of a large amount of SCGFalpha in the stroma of GISTs after imatinib therapy. J Transl Med 2011; 9: 158.
35. Hiraoka A, Yano Ki K, Kagami N, et al. Stem cell growth factor: in situ hybridization analysis on the gene expression, molecular characterization and in vitro proliferative activity of a recombinant preparation on primitive hematopoietic progenitor cells. Hematol J 2001; 2: 307-15.

36. Schmitt CA, Fridman JS, Yang M, Baranov E, Hoffman RM, Lowe SW. Dissecting p53 tumor suppressor functions in vivo. Cancer Cell 2002; 1: 289-98.
37. Ghiringhelli F, Menard C, Terme M, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. J Exp Med 2005; 202: 1075-85.
38. Corless CL, Barnett CM, Heinrich MC. Gastrointestinal stromal tumours: origin and molecular oncology. Nat Rev Cancer 2011; 11: 865-78.
39. Joensuu H, Vehtari A, Riihimaki J, et al. Risk of recurrence of gastrointestinal stromal tumour after surgery: an analysis of pooled population-based cohorts. Lancet Oncol 2011; 13: 265-74.
40. Ylipaa A, Hunt KK, Yang J, et al. Integrative genomic characterization and a genomic staging system for gastrointestinal stromal tumors. Cancer 2010; 117: 380-9.
41. Chibon F, Lagarde P, Salas S, et al. Validated prediction of clinical outcome in sarcomas and multiple types of cancer on the basis of a gene expression signature related to genome complexity. Nat Med 2010; 16: 781-7.
42. Lagarde P, Perot G, Kauffmann A, et al. Mitotic checkpoints and chromosome instability are strong predictors of clinical outcome in gastrointestinal stromal tumors. Clin Cancer Res 2011; 18: 826-38.
43. Ricci R, Arena V, Castri F, et al. Role of p16/INK4a in gastrointestinal stromal tumor progression. Am J Clin Pathol 2004; 122: 35-43.
44. Nakamura N, Yamamoto H, Yao T, et al. Prognostic significance of expressions of cell-cycle regulatory proteins in gastrointestinal stromal tumor and the relevance of the risk grade. Hum Pathol 2005; 36: 828-37.
45. Romeo S, Debiec-Rychter M, Van Glabbeke M, et al. Cell cycle/apoptosis molecule expression correlates with imatinib response in patients with advanced gastrointestinal stromal tumors. Clin Cancer Res 2009; 15: 4191-8.
46. Elie N, Plancoulaine B, Signolle JP, Herlin P. A simple way of quantifying immunostained cell nuclei on the whole histologic section. Cytometry A 2003; 56: 37-45.

Table 1. Characteristics of GIST patients for the immunohistochemistry stud

	LOCALIZED DISEASE Number (Frequency%)	METASTATIC DISEASE Number (Frequency%)
Patients	N=67	N=24
Gender (male/female)	36/31 (54/46)	16/8 (67/33)
Age at diagnosis (mean± SD)	57±28	56±28
Primary tumor site		
Stomach	35(52)	4 (17)
Small intestine	14(21)	13 (54)
Others	18(27)	7 (29)
Miettinen Classification		NA
High risk	34(51)	
Intermediate risk	9 (14)	
Low risk	19(28)	
ND*	5 (7)	
Site of Metastasis	NA**	
Liver		5 (21)
Peritoneum		12 (50)
Both		5 (21)
ND*		2 (8)
KIT mutation		
Exon 11	42(63)	10 (42)
Exon 9	4 (6)	2 (8)
Wild-type	13 (19)	5 (21)
ND*	8 (12)	7 (29)
Imatinib targeted therapy		
Untreated	38 (57)	3 (11)
Neo-adjuvant	10 (15)	14 (58)
Adjuvant	19 (28)	7 (29)
Events		
No event	43(64)	0 (0)
Local relapse	2(3)	2 (8)
Metastatic relapse	10(15)	17 (71)
Local+Metastatic relapse	12(18)	5 (21)
Clinical outcome ***		
NED	45(67)	2 (8)
AWD	7(10)	9 (38)
Dead of Disease	9(14)	11 (46)
Dead unrelated to disease	6 (9)	2 (8)
Follow up (years± SD)	4.95 ±16	4.1±12

* ND: Not Determined; ** NA: Not Applicable; ***NED: Non Evolutive Disease, AWD: Alive with Disease

Table 2 : Prognostic factors in the series with localized GIST

Parameter	N	Univariate analysis		Cox model		Univariate analysis		Cox model	
		MedianPFS *(months)*	**p**	**HR**	**p**	**Median OS *(months)***	**p**	**HR**	**p**
Miettinen score			***.02***	***7.9***	***0.003***		0.06	3.0	0.1
<10%	19	NR				NR			
10-50%	7	145				163			
>50%	27	77				NR			
NKp46			***.008***	***0.2***	***0.03***		0.15	-	
<13/hpf	27	77				163			
>13/hpf	26	NR				NR			
CD3			***.002***	***0.1***	***0.001***		0.38	-	
<=9.9%	26	45				NR			
>9.9%	27	145				163			
FoxP3			***.16***	***-***					
<=1.3/hpf	27	145				163	0.13	-	
>1.3/hpf	26	77				NR			

NR : not reached; PFS: progression free survival; OS: overall survival; HR : hazard ratio. P values calculated with the Logrank test for univariate analysis. The following parameters were tested in univariate analysis and found not significantly correlated to survival: gender, nature of the mutation. For the Cox models, all four parameters abiove (Miettinen scre, CD3, NKp46, FOXP3) were included in the model.

Figures legend

Figure 1. T and NK cell infiltration in localized and metastatic GIST at diagnosis.

A-B. Enumeration of GIST TILs in immunohistochemistry. (A) Representative microphotographs of immunohistochemical stainings of primary and metastatic paraffin-embedded GIST using antibodies specific fo NKp46 (left), CD3 (middle) or Foxp3 (right). The number of specimen is indicated. The mean numbers of $NKp46^+$ and $Foxp3^+$ cells enumerated in 10 independent fields observed at x200 power of magnification are depicted per field. As for the CD3 staining, the percentages of positive cells scanned on the whole slide are indicated. (B) The precise enumeration of $NKp46^+$ cells was performed strictly in fibrous trabeculae and in the tumor foci of primary paraffin-embedded GIST by analyzing at least 10 representative fields. The median numbers/field are represented, each dot featuring one GIST. (C-D) Correlations between $CD3^+$ T cells and $NKp46^+$ infiltrate (C) and between $Foxp3^+$ cells and $NKp46^+$ infiltrates (D). *E-F. Correlations between immune parameters and the KIT mutational status, as well as the Miettinen score.* The enumeration of NKp46, CD3 and Foxp3 cells (left, middle and right panel respectively) was correlated with the presence of KIT exon 11 mutation (WT meaning no detectable mutations in *KIT* gene) (E) or with the Miettinen score (low and intermediate risk versus high risk) (F). Linear regression, Wilcoxon matched paired or Mann Whitney tests: *$p<0.05$, **$p<0.01$, *** $p<0.001$.

Figure 2. T and NK cell infiltrates in GIST are activated.

A. Flow cytometry analyses of NK and T cells in $CD45^+$ live leukocytes from freshly dissociated GIST compared with circulating blood lymphocytes or soft tissue sarcomas (STS, Supplemental Table 1). The percentages of NK cells or $CD3^+CD8^+$ or $CD3^+CD4^+$ or regulatory T cells contained among $CD45^+$ live TILs in 9 primary GIST at diagnosis and 6 STS are depicted in blood and tumor beds in a paired manner. (B) The expression levels of CD69 in blood and tumor NK cells are indicated in a typical dot plot analysis (left panel) and for all 9 primary GIST at diagnosis (right panel). (C-E) TILs were subjected to a 2 hours PMA/ionomycine stimulation after *ex vivo* dissociation and analyzed by flow cytometry using intracellular

stainings for Th1 cytokines (IFNγ and TNFα) gating on NK (C), $CD8^+$ (D) or $CD4^+$ T cell subsets (E). A typical dot plot analysis is shown indicating the means±SEM of the percentages of IFNγ (upper quadrant) and TNFα (lower quadrant) positive cells obtained in all specimen. (F) Representative dot plots of CD16, CX3CR1 and NKp80 expression on $CD3^-CD56^+$NK cells comparing paired blood and GIST tumor NK cell phenotypes (overlay of tumor (blue) and blood (red) NK cells). (G) All NKR and KIR were analyzed in flow cytometry gating on infiltrating tumor $CD3^-CD56^+CD45^+$ NK cells in 14 GIST (9 at diagnosis and 5 post IM) and 6 STS. Wilcoxon matched paired or Mann Whitney test: *p<0.05, **p<0.01, *** p<0.001.

Figure 3. Effects of IM on the dynamics of T and NK cell subsets in GIST.

The effects of IM on GIST TILs infiltrates were evaluated by immunohistochemistry (as shown in Fig. 1). (A) A representative micrograph picture of NKp46 staining (at x200 power of magnification) is shown in fibrous trabeculae (FT) and in tumor nests (TN). (B) The precise enumeration of $NKp46^+$ cells was performed strictly in fibrous trabeculae and in the tumor nests by analyzing at least 10 representative fields. The median numbers/field are represented, each dot featuring one GIST before and after IM in primary localized or metastatic GIST. The number of specimen is indicated on the graph. (C-D) Similar analyzes were performed for $CD3^+$(C) and $Foxp3^+$(D) infiltrates from the same specimen. Mann-Whitney test: *p<0.05, **p<0.01, *** p<0.001.

Figure 4. Immunoselection against MHC class I positive tumor cells associated with IM therapy.

A-B. Immunohistochemical analyses of primary paraffin-embedded GIST using the EMR85 antibody. The percentages of GIST presenting with a negative (-), positive (+) or heterogeneous (+/-) staining at diagnosis (n=32) and after neoadjuvant IM (n=10) are indicated (A). The enumeration of $CD8^+$ and $NKp46^+$ cells in all the EMR85 positive versus negative tumors is represented (B, left and right panels). (C) A representative micrograph picture of a heterogeneous (+/-) staining using EMR85 Ab and the adjacent tissue section stained with H&E, anti-CD3 and anti-CD8 Ab. Enumeration of $CD3^+$ cells in EMR85 positive versus negative areas in all heterogenous cases is represented in percentages (C, right

panel). *D. Flow cytometry analyses of MHC class I, MHC class II, and MHC like molecules as well as B7 family members on freshly dissociated primary GIST*. Ratio of MFI for 9 specimen analyzed at diagnosis and 5 specimen after neoadjuvant IM are depicted. *E-F. Direct effects of IM on tumor cells in vitro.* (E) MHC class I, B7-H6, MICA/B and isotype control in TF417 (sensitive to IM) versus TF816 (resistant to IM) exposed or not to IM in vitro. (F) Effector functions of allogeneic NK cells (enriched from HV) against TF417 versus TF816 after a coculture in the presence or absence of IM. Membrane expression of CD107a and IFNγ secretion were analyzed by flow cytometry and ELISA respectively. Unpaired-T Test or Mann Whitney test: *p<0.05, **p<0.01.

Figure 5. Prognostic value of T and NK cell infiltrates in localized GIST.

(A-C) Progression-free survival (PFS) of 53 localized GIST patients according to the median values of NKp46, CD3 or Foxp3 positive cells infiltrating the tumor at diagnosis (left, middle and right panels). (D) Kaplan Meier curves of PFS obtained by stratifying the entire cohort of primary GIST into four groups according to the median of $NKp46^+$ and $CD3^+$ cells. Multivariate analyses are presented in Table 2.

Figure 6. Impact of immune parameters on localized GIST with high-risk Miettinen scores.

Kaplan Meier curves of PFS obtained by stratifying the whole cohort of primary GIST at diagnosis into several groups according to the median of NKp46 or CD3 positive cells and the Kit mutation (A-B, N=46, with N=12 KIT WT and N=34 KIT exon 11 GIST bearing patients) or the Miettinen score alone (C, N=53 with N=19 low, N=8 intermediate and N=26 high risk) or a combination of Miettinen scores and immune parameters (D-E). Log-Rank (Mantel Cox): *p<0.05, **p<0.01, *** p<0.001.

Supplemental Table 1. Characteristics of GIST and STS patients studied in flow cytometry.

	Number (Frequency%)
GIST Patients	N=14
Gender (male/female)	6/8 (43/57)
Age at diagnosis(mean± SD)	59±17
Primarytumor site	
Stomach	5(36)
Small intestine	5(36)
Others	4(28)
Metastasis	2(14)
Site of Metastasis	
Liver	2
Miettinen Classification	
High risk	6(43)
Intermediaterisk	1(7)
Lowrisk	7(50)
KIT mutation	
Exon 11	6(43)
Exon 9	1(7)
Wild-type	0(0)
ND*	7(50)
Imatinib targeted therapy	
Untreated	6(43)
Neo-adjuvant	5(36)
Adjuvant	3(21)
Events	
No event	12(86)
Local relapse	1(7)
Metastatic relapse	0(0)
Clinical outcome	
Non evolutive disease	11(78)
Alive with disease	3(22)
Follow up (months ; means± SD)	15 ± 27
	Numbers (N=)
Soft Tissue Sarcoma Patients	N=6
Gender (male/female)	5/1(83/17)
Age at diagnosis (mean± SD)	48±19
Type of Sarcoma	
Rhabdomyosarcoma	2(33)
Neurosarcoma	2(33)
Liposarcoma	1(17)
Spindle cell sarcoma	1(17)
Treatment	
Untreated	2(33)
Radiotherapy	2(33)
Adriamycine+Ifosfamide	2(33)

* ND: Not Determined

Supplemental Table 2: Antibodies for flow cytometry and IHC.

Ab	Clone	Conjugated	Company
CD3	BW264/56	VioBlue	Miltenyi
CD45	J33	APC-750	Beckman Coulter
CD56	N901	PC7	Beckman Coulter
CD4	SK3	PerCP	BD
CD8	RPA-T8	Fitc	BD
CD16	3G8	Fitc	Beckman Coulter
CD94	HP-3D9	APC	BD
NKp30	AF29-4D12	PE	Miltenyi
NKp44	2.29	APC	Miltenyi
NKp46	9 E2	APC	Miltenyi
NKG2D	BAT221	APC	Miltenyi
NKG2A	131411	APC	R&D
NKG2C	134591	PerCP	R&D
NKp80	239127	APC	R&D
DNAM-1	102511	Pe	R&D
CD158a, h	11PB6	FITC	Miltenyi
CD158b	DX27	PerCP	Miltenyi
CD158e, k	5.133	PE	Miltenyi
CD158i	JJC11.6	APC	Miltenyi
CD69	FN50	FITC	BD
CX3CR1	2A9-1	FITC	BD
CXCR3	49801	PerCP	R&D
CXCR1	8F1	FITC	Biolegend
CD25	M-A251	PE	BD
CD127	eBioRDR5	AF647	eBioscience
CD34	581	FITC	Beckman Coulter
CD117 (KIT)	M-A251	PE	BD
HLA-ABC	G46-2.6	APC	BD
HLA-DR	Immu-357	Pacific Blue	Beckman Coulter
HLA-E	3D12	PE	Biolegend
B7H1 (PDL-1)	29 E.2A4	APC	Biolegend
B7H3	DCN70	PE	Biolegend
B7H6	17B1.3	AF674	E.Vivier
MICA/B	6D4	APC	Biolegend
IFN γ	25723.11	FITC	BD
TNF α	6401.1111	APC	R&D
NKp46	195314	5µg/mL	R&D
CD3	A452	1µg/mL	DakoCytomation
CD8	SP16	1/100	Springbioscience
FoxP3	mAbcam450	4µg/mL	Abcam
Pan HLA class I	EMR8-5	15µg/mL	Cliniscience

Supplemental Figure legends

Supplemental Figure 1. Correlation between T and NK cell infiltrates and the 3-digit Miettinen score.

The enumeration of NKp46, CD3 and Foxp3 cells (left, middle and right panel respectively, (as defined in Figure 1) was correlated with the mitotic index in 50 fields at a x400 power of magnification (A), with the tumor location (B, S:Stomach, SI: Small Intestine, or other) and with the tumor size in cm (C). The number of specimens is indicated on the figure. The median numbers/field are represented, each dot featuring one GIST. Mann Whitney test : *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Supplemental Figure 2. GIST TIls are mainly composed of $CD4^+$ T cells.

Flow cytometric analyses of the percentages of $CD8^+$, $CD4^+$ T cells and $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$ T cells in primary GIST and STS are indicated for paired blood and tumor specimen.

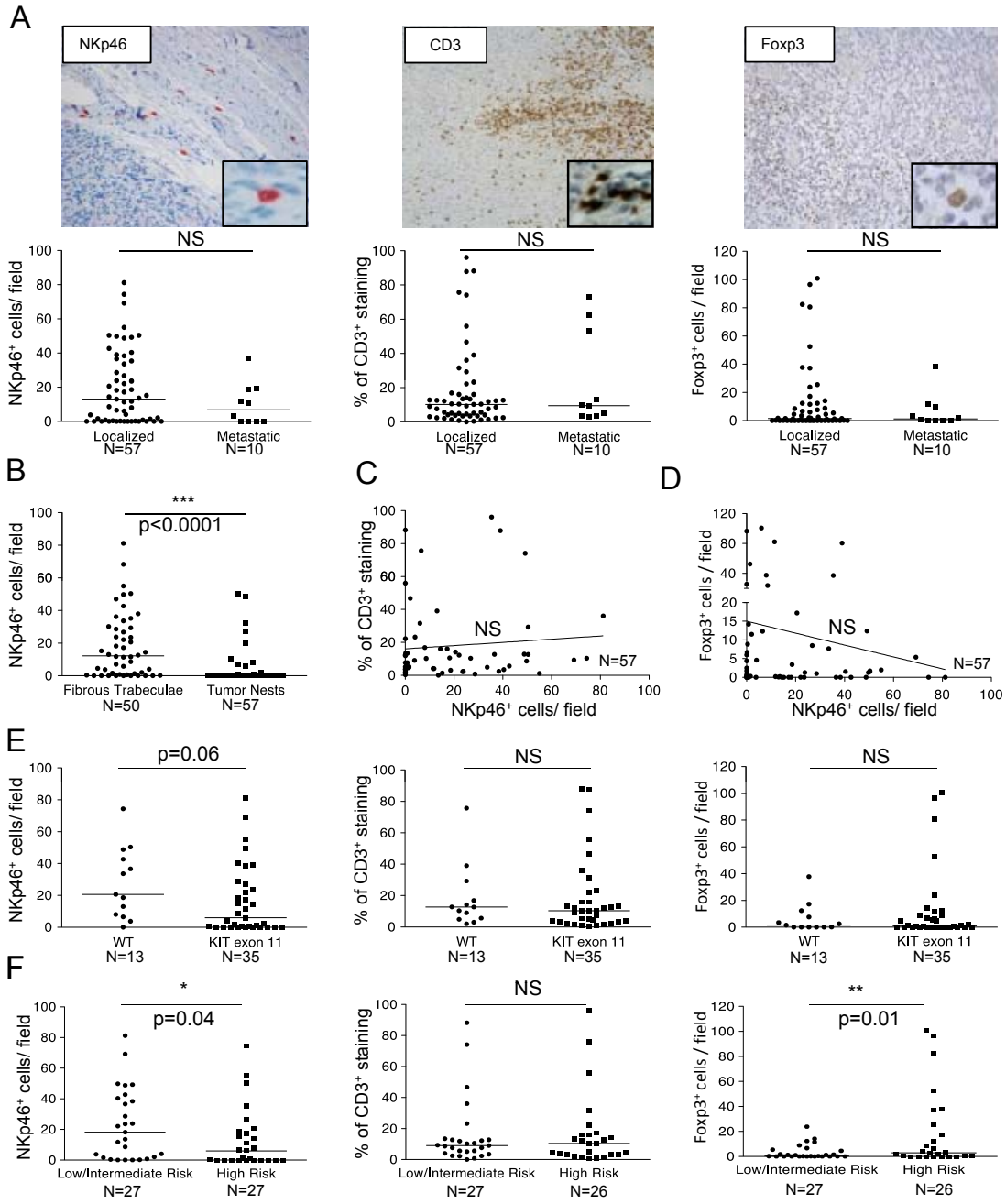

A
NKp46
CD3
Foxp3
NS
NKp46+ cells/ field
% of CD3+ staining
Foxp3+ cells / field
Localized N=57
Metastatic N=10
B
***
p<0.0001
Fibrous Trabeculae N=50
Tumor Nests N=57
C
NS
N=57
NKp46+ cells/ field
D
NS
N=57
NKp46+ cells/ field
E
p=0.06
NS
WT N=13
KIT exon 11 N=35
F
*
p=0.04
**
p=0.01
Low/Intermediate Risk N=27
High Risk N=27
High Risk N=26

Figure 1

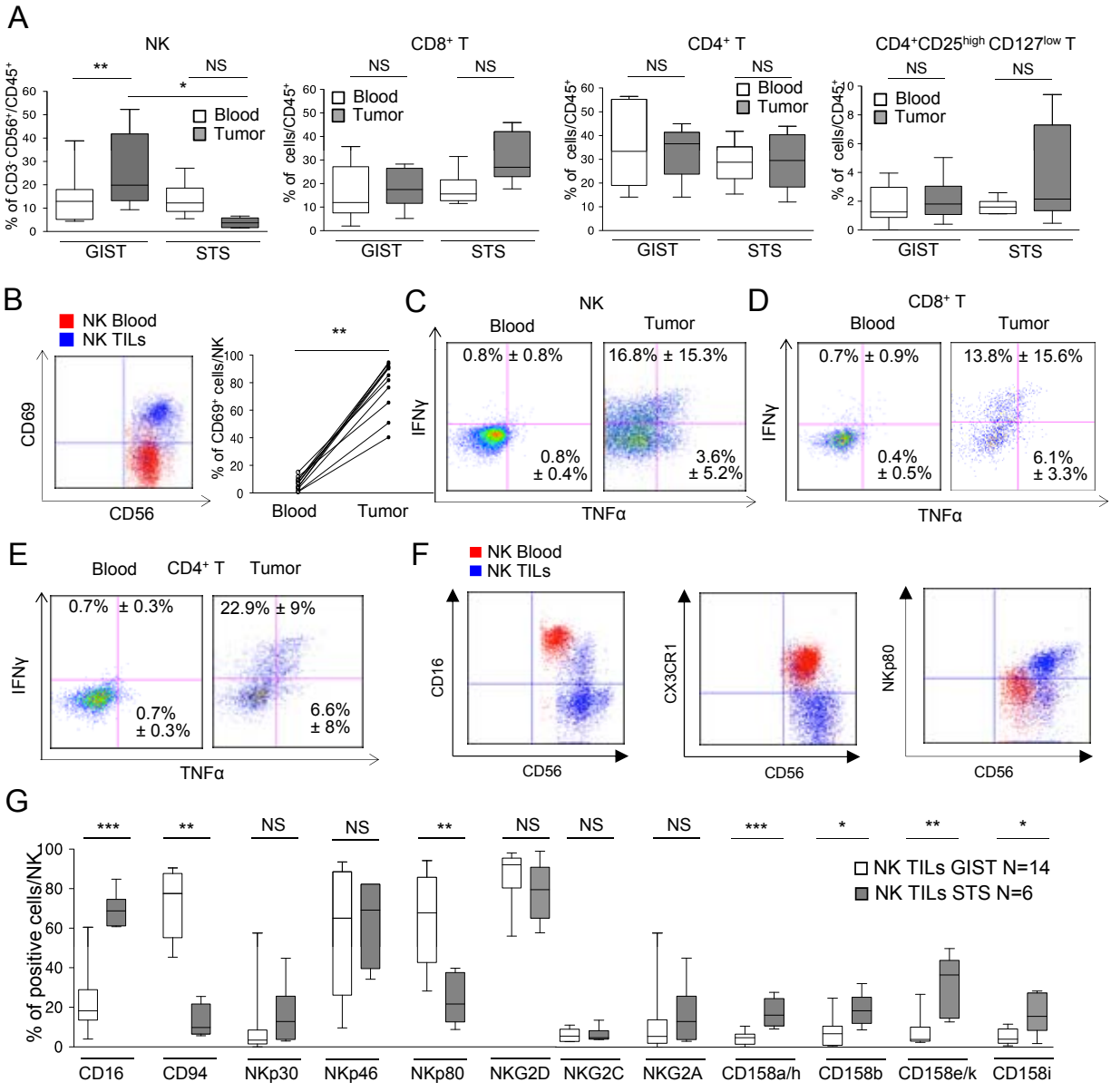

A
NK
CD8⁺ T
CD4⁺ T
CD4⁺CD25high CD127low T
Blood
Tumor
GIST
STS
B
NK Blood
NK TILs
CD69
CD56
C
NK
IFNγ
TNFα
0.8% ± 0.8%
0.8% ± 0.4%
16.8% ± 15.3%
3.6% ± 5.2%
D
CD8⁺ T
0.7% ± 0.9%
0.4% ± 0.5%
13.8% ± 15.6%
6.1% ± 3.3%
E
CD4⁺ T
0.7% ± 0.3%
0.7% ± 0.3%
22.9% ± 9%
6.6% ± 8%
F
CD16
CX3CR1
NKp80
G
% of positive cells/NK
NK TILs GIST N=14
NK TILs STS N=6
CD16
CD94
NKp30
NKp46
NKp80
NKG2D
NKG2C
NKG2A
CD158a/h
CD158b
CD158e/k
CD158i

Figure 2

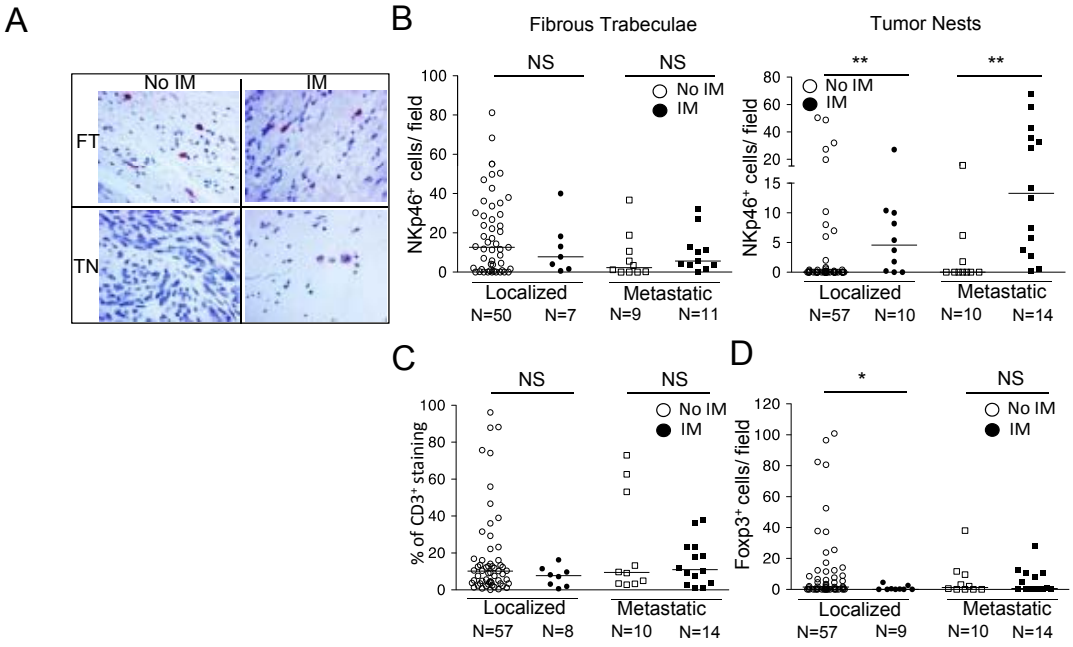

A
No IM
IM
FT
TN
B
Fibrous Trabeculae
Tumor Nests
NS
NS
**
**
No IM
IM
NKp46+ cells/ field
Localized
Metastatic
N=50
N=7
N=9
N=11
N=57
N=10
N=10
N=14
C
D
% of CD3+ staining
Foxp3+ cells/ field
*
N=57
N=8
N=10
N=14
N=57
N=9
N=10
N=14

Figure 3

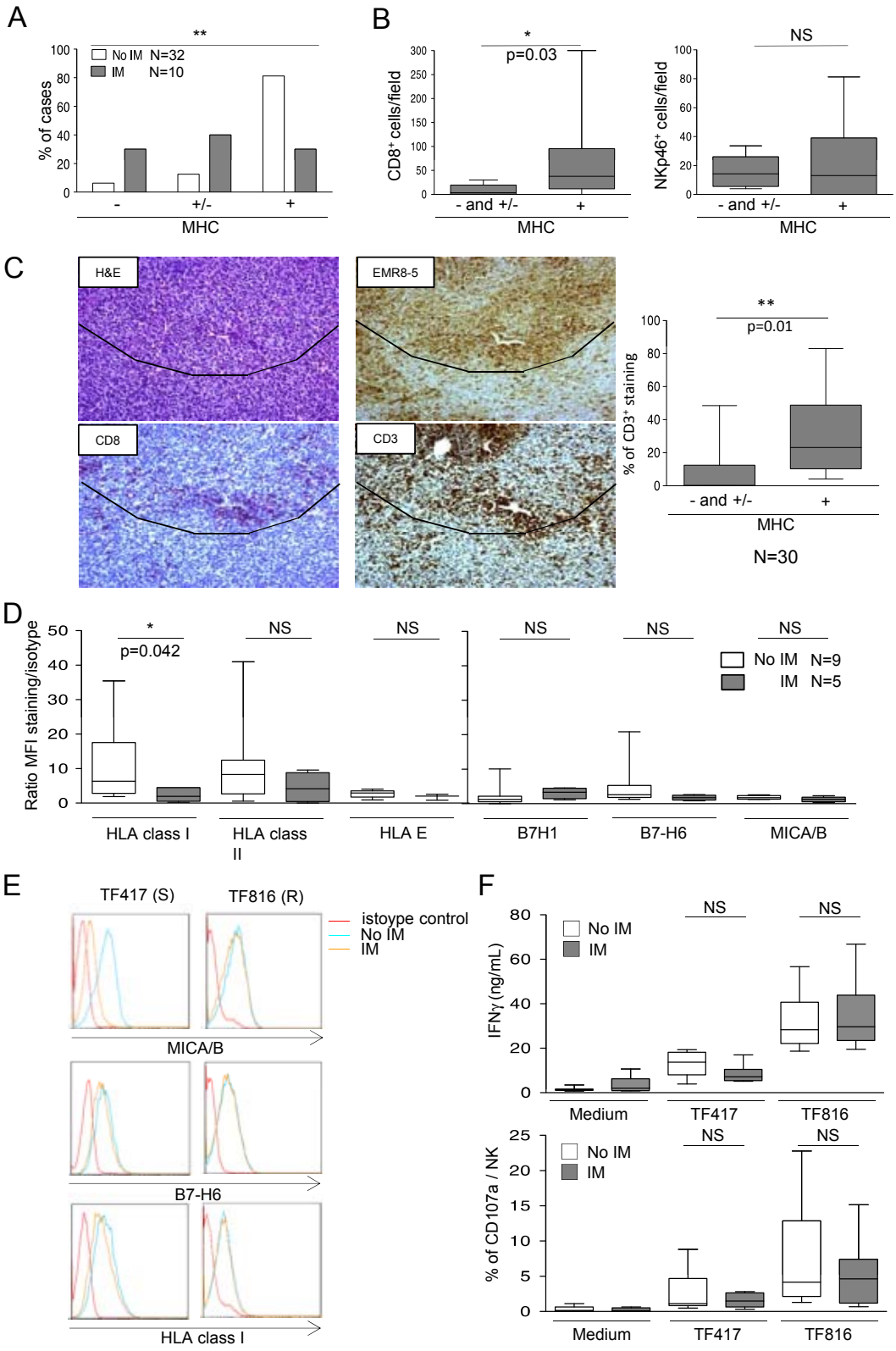

A
**
No IM N=32
IM N=10
% of cases
100
80
60
40
20
0
-
+/-
+
MHC
B
*
p=0.03
CD8+ cells/field
300
250
200
150
100
50
0
- and +/-
+
MHC
NS
NKp46+ cells/field
100
80
60
40
20
0
- and +/-
+
MHC
C
H&E
EMR8-5
CD8
CD3
**
p=0.01
% of CD3+ staining
100
80
60
40
20
0
- and +/-
+
MHC
N=30
D
Ratio MFI staining/isotype
50
40
30
20
10
0
*
p=0.042
NS
NS
NS
NS
NS
No IM N=9
IM N=5
HLA class I
HLA class II
HLA E
B7H1
B7-H6
MICA/B
E
TF417 (S)
TF816 (R)
istoype control
No IM
IM
MICA/B
B7-H6
HLA class I
F
IFNγ (ng/mL)
80
60
40
20
0
No IM
IM
NS
NS
Medium
TF417
TF816
% of CD107a / NK
25
20
15
10
5
0
No IM
IM
NS
NS
Medium
TF417
TF816

Figure 4

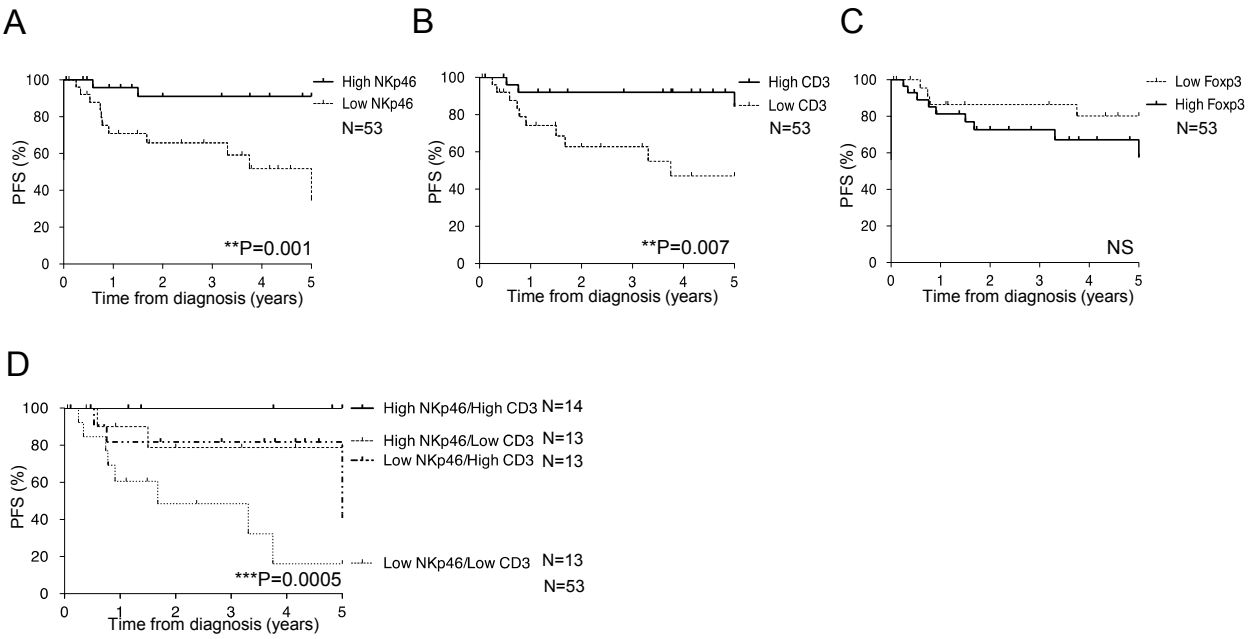

A
B
C
D
PFS (%)
Time from diagnosis (years)
High NKp46
Low NKp46
N=53
**P=0.001
High CD3
Low CD3
N=53
**P=0.007
Low Foxp3
High Foxp3
N=53
NS
High NKp46/High CD3 N=14
High NKp46/Low CD3 N=13
Low NKp46/High CD3 N=13
Low NKp46/Low CD3 N=13
N=53
***P=0.0005

Figure 5

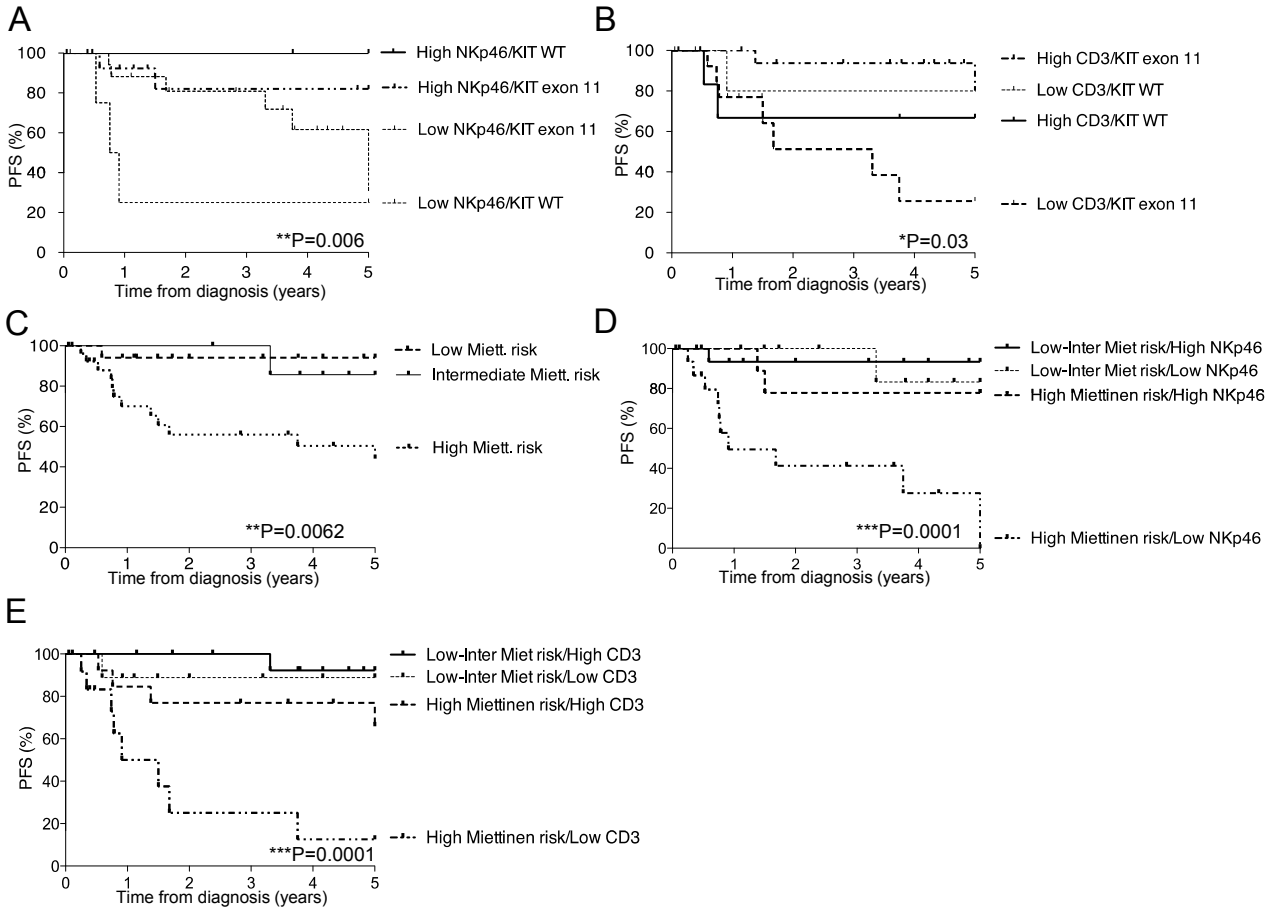
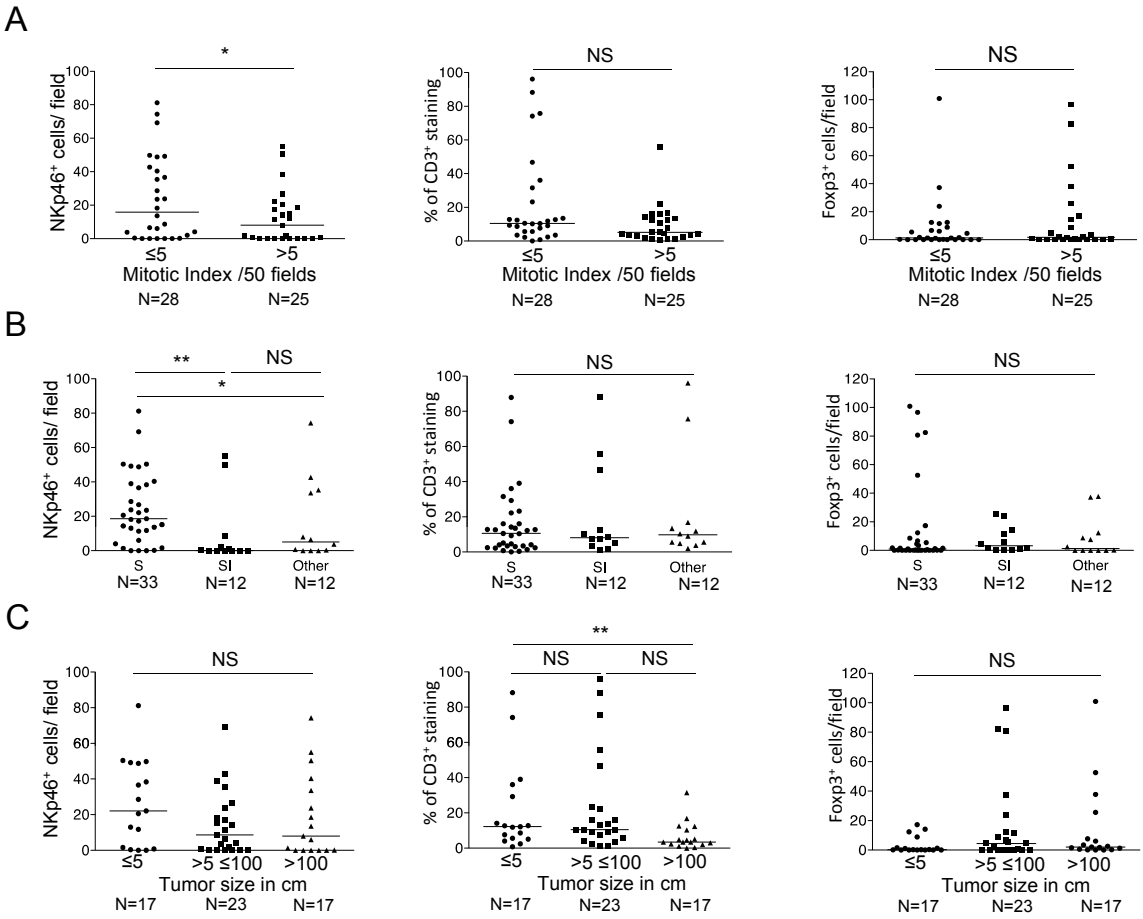
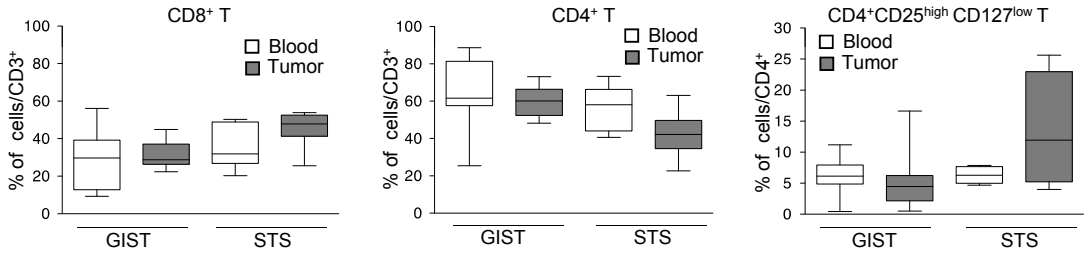

A
PFS (%)
Time from diagnosis (years)
High NKp46/KIT WT
High NKp46/KIT exon 11
Low NKp46/KIT exon 11
Low NKp46/KIT WT
**P=0.006
B
PFS (%)
Time from diagnosis (years)
High CD3/KIT exon 11
Low CD3/KIT WT
High CD3/KIT WT
Low CD3/KIT exon 11
*P=0.03
C
PFS (%)
Time from diagnosis (years)
Low Miett. risk
Intermediate Miett. risk
High Miett. risk
**P=0.0062
D
PFS (%)
Time from diagnosis (years)
Low-Inter Miet risk/High NKp46
Low-Inter Miet risk/Low NKp46
High Miettinen risk/High NKp46
High Miettinen risk/Low NKp46
***P=0.0001
E
PFS (%)
Time from diagnosis (years)
Low-Inter Miet risk/High CD3
Low-Inter Miet risk/Low CD3
High Miettinen risk/High CD3
High Miettinen risk/Low CD3
***P=0.0001

Figure 6



Supplemental Figure 1



Supplemental Figure 2

DISCUSSION

Si la puissance d'une réaction immunitaire dirigée contre la tumeur a longtemps été négligée, certains traitements anticancéreux sont néanmoins capables d'exploiter le système immunitaire pour éradiquer la maladie. Dans ce contexte, notre laboratoire s'est particulièrement intéressé à l'IM dont plusieurs études révèlent l'importance des effets « *off-target* ». En effet, l'IM permet d'obtenir *in vivo* des effets antitumoraux sur des lignées tumorales murines ne répondant pas à ce même traitement *in vitro* [235]. De manière inattendue, l'IM se révèle également efficace chez certains patients atteints de GIST pourtant dépourvues de mutations activatrices pour les cibles de l'IM (c-kit et PDGFRα) [204]. Notre équipe de recherche a en partie élucidé les mécanismes impliqués dans ces effets « *off-target* » en mettant en évidence les effets immunomodulateurs de l'IM. Le mécanisme impliqué est une inhibition de c-kit sur les DC, qui secondairement entraine une activation des cellules NK, pouvant ainsi exercer une activité cytotoxique sur les cellules de GIST [204]. Les effets immunomodulateurs de l'IM constituent également un facteur pronostique indépendant et sont associés à une meilleure survie sans progression chez les patients atteints de GIST [205,206,293]. Dans un modèle murin, l'association de l'IM à un adjuvant des NK, l'IL-2, a montré un réel intérêt thérapeutique [292], permettant d'entreprendre une étude de phase 1 associant l'IM à l'IL-2.

Cet essai clinique de phase 1, baptisé IMAIL-2, est la première étude clinique associant le CTX, l'IM et l'IL-2. L'objectif principal de cette étude était donc d'évaluer la tolérance de cette association chez des patients en impasse thérapeutique et de déterminer la dose recommandée d'IL-2. Le schéma classique d'escalade de doses nous a permis de définir la DMT d'IL-2 associée à 400 mg d'IM comme étant 6 MUI par jour. Si le palier 3 (9 MUI d'IL-2 par jour) a été mal toléré avec des toxicités limitantes chez deux des trois patients inclus, le palier 2 a été dans son ensemble bien toléré, malgré des effets indésirables observés pour chacun des onze patients inclus à ce palier. Ces effets indésirables correspondent à ceux observés lors de l'utilisation d'IM ou d'IL-2 en monothérapie. Mais l'administration concomitante de ces deux médicaments semble potentialiser la survenue des effets indésirables : les doses d'IM et d'IL-2 en association sont en effet beaucoup plus faibles que celles utilisés en monothérapie. Dans l'adénocarcinome rénal métastatique, l'IL-2 est administrée en injection sous-cutanée de 18 MUI/m^2 – soit 30.6 MUI pour une surface corporelle de 1.7 m^2. De même, l'IM peut être administré en monothérapie à la posologie de 800 mg avec un profil de tolérance favorable. Cette moins bonne tolérance peut s'expliquer

par une modification des paramètres pharmacocinétiques lors de l'association de ces deux molécules.

En effet, à la dose fixe de 6 MUI, la co-administration d'IL-2 augmente l'exposition de l'IM et de son métabolite. Après 10 jours d'IM seul, l'état d'équilibre est déjà atteint : l'$AUC_{(0-24)}$ est identique à celle observée dans une autre étude après 28 jours de traitement à la même posologie (38.8 ± 15.9 µg.h/mL) [307]. Pourtant, entre J10 et J14, la Cmax et l'AUC de l'IM sont respectivement augmentées de 49% et de 61%. Cette augmentation d'exposition de l'IM peut être liée à la capacité de l'IL-2 à diminuer l'activité du cytochrome P450 et des mono-oxygénases [308]. La diminution des cytochromes hépatiques est toutefois observée pour des doses d'IL-2 plus importantes (6 MUI/m^2 voire 9 MUI/m^2 en i.v. pendant 4 jours). De plus, dans notre étude le CGP74588, métabolite de l'IM, est modifié dans les mêmes proportions que l'IM ; cette observation n'est pas en faveur d'une modification d'activité des cytochromes. L'IL-2 influence également l'expression et l'activité de transporteurs d'efflux tel que la P-gp (glycoprotéine P) ou la BCRP (*breast cancer resistance protein*) [309,310]. Or ces transporteurs d'efflux s'opposent à l'absorption intestinale de nombreux médicaments dont l'IM [311]. Au niveau intestinal, une diminution de l'activité de ces transporteurs par l'IL-2 pourrait donc augmenter la biodisponibilité orale de l'IM. Cette hypothèse est confortée par des données murines mettant en évidence une diminution de l'expression intestinale de la P-gp et une augmentation de la Cmax de l'IM dans le groupe traité par l'association IM + IL-2 par rapport au groupe traité par IM seul [310]. Bien que la biodisponibilité absolue moyenne de l'IM soit de 98%, il existe une forte variabilité inter-patient. De plus, une étude récente réalisée sur 50 patients atteints de GIST montre une diminution de la biodisponibilité de l'IM d'environ 30% après 3 mois de traitement [312]. Différents modèles ont montré que l'utilisation chronique d'IM augmente l'expression de la P-gp et de BCRP à la surface des cellules Caco [313] ainsi qu'au niveau du duodénum de souris traitées par 11 jours d'IM [310]. Associer l'IL-2 à l'IM pourrait donc, en diminuant l'activité des transporteurs d'efflux, rétablir l'absorption de l'IM et ainsi diminuer certains mécanismes de résistance à l'IM liés à la baisse d'absorption. Afin de confirmer cette hypothèse, les effets de l'IL-2 sur l'expression et l'activité des P-gp sont en cours d'investigation dans notre laboratoire. Concernant l'IL-2, l'analyse du sCD25, de la t1/2 et de l'AUC ne montre pas de modification des paramètres pharmacocinétiques de l'IL-2 en association avec l'IM.

L'administration de faibles doses d'IL-2 augmente les proportions et les fonctions de lymphocytes Treg [314]. Or les Treg inhibent les fonctions NK et sont donc susceptibles de limiter l'intérêt de l'association IM + IL-2. L'administration de faibles doses de CTX entre J-

21 et J14 avait donc pour intérêt de diminuer cet effet délétère en inhibant et en déplétant les Treg sans provoquer de lymphopénie significative [137]. Cette stratégie semble donc s'être avérée efficace. D'une part, l'administration de CTX n'aggrave pas la lymphopénie présente avant tout traitement pour la majorité des patients. Et d'autre part, l'augmentation de prolifération des Treg suite à l'administration d'IL-2 est faible en comparaison à celle observée dans deux autres études. Dans la première, les patients atteints de vascularite induite par l'hépatite C reçoivent un premier cycle de 5 jours d'IL-2 à la dose quotidienne de 1.5 MUI suivi de 3 cycles à 3 MUI. Dans ces conditions, la proportion de Treg est augmentée d'un facteur deux après le premier cycle et d'un facteur trois à quatre après les cycles suivants [314]. Dans la deuxième étude, l'IL-2 est administré à faible dose (1 MUI/m^2/jour pendant huit semaines) à des patients présentant une réaction du greffon contre l'hôte. Après quatre semaines d'IL-2, le nombre absolu de Treg est huit fois supérieur à celui observé avant traitement [315]. Dans l'essai IMAIL-2, la proportion des Treg double entre J10 et J14 pour seulement 3 patients, malgré 5 jours d'IL-2 à 6 MUI par jour. L'administration de CTX de J-21 à J14 n'est pourtant pas la seule hypothèse pouvant expliquer la faible expansion des Treg malgré le traitement par IL-2. D'une part, plusieurs études s'accordent à montrer un effet inhibiteur de l'IM sur les Treg. Dans un modèle murin de GIST et chez les patients atteints de GIST, l'IM diminue l'expression tumorale de l'enzyme IDO, augmente l'apoptose des Treg intra-tumoraux et diminue ainsi leur effet immunosuppresseur [213]. Une autre étude murine montre un effet inhibiteur direct de l'IM sur les lymphocytes Treg [215]. Cette inhibition des fonctions Treg résulte de la diminution d'expression de Foxp3 consécutive à un défaut de phosphorylation de STAT3 et STAT5. D'autre part, cette différence peut être liée aux patients dans la mesure où les patients atteints d'un cancer ont des proportions de Treg d'emblée plus élevées et donc moins susceptibles de doubler leur proportion.

Si aucune aggravation de la lymphopénie n'est observée entre J-21 et J10, une diminution significative des lymphocytes et des plaquettes survient par contre entre J10 et J14. Cette baisse semble donc plutôt imputable à l'IL-2. La thrombopénie est un effet indésirable déjà décrit lors d'administration d'IL-2 à des doses plus importantes [316,317]. Dans notre étude, même si la diminution de plaquettes est significative, le nombre absolu de plaquettes après 5 jours d'IL-2 ne descend jamais en dessous des valeurs normales (150-400 G/L). Pour les patients ayant reçu plusieurs cycles, la baisse des plaquettes n'est pas cumulative et le nombre absolu initial est récupéré au cours de l'intercure (données non publiées) et ne diminue à nouveau qu'après l'administration d'IL-2. L'impact de l'IL-2 sur les lymphocytes a également été décrit et semble être du à une redistribution des lymphocytes [316]

et/ou à une activation de la mort cellulaire [318,319]. Une pancytopénie pouvant être observée lors de traitement par IM, la diminution des lymphocytes et des plaquettes peut également être liée à l'augmentation de l'exposition à l'IM entre J10 et J14.

L'étude phénotypique révèle que les populations de lymphocytes ne sont pas affectées de manière équivalente. Alors que les nombres absolus de Treg et de cellules NK restent relativement stables, les LB et les LT diminuent significativement entre J10 et J14. Au sein des LT, les LT $CD8^+$ sont plus diminués que les LT $CD4^+$ et on observe donc une augmentation significative du ratio $CD4^+$:$CD8^+$ suite à l'administration d'IL-2. Cette augmentation du ratio $CD4^+$:$CD8^+$ est également retrouvée suite à l'administration de faibles doses d'IL-2 chez des patients infectés par le VIH [320]. Dans notre étude, bien que l'augmentation du ratio $CD4^+$:$CD8^+$ ne soit observée qu'après un cycle complet comprenant CTX, IM et IL-2, présenter un ratio $CD4^+$:$CD8^+$ élevé est associé à une survie meilleure dès les 21 jours de CTX et cette corrélation se poursuit après introduction de l'IM puis de l'IL-2.

Cet essai clinique montre également que les marqueurs NK (CD56, HLA-DR et TRAIL) sont significativement augmentés par la combinaison IM + IL-2. Dans une étude précédente, Caligiuri et *al*. avaient également observé une accumulation de cellules NK $CD56^{bright}$ suite à l'administration en monothérapie de faibles doses d'IL-2. Mais de manière à augmenter efficacement les fonctions cytotoxiques des NK, des doses intermédiaires d'IL-2 se sont avérées nécessaires [321]. Des données équivalentes ont également été obtenues chez des patients infectés par le VIH chez qui les cellules NK $CD56^{bright}$ sont fortement augmentées suite à l'administration de faibles doses d'IL-2 [322]. Dans notre étude, l'IL-2 est utilisée conjointement à l'IM. Nous nous sommes demandé quelle serait l'influence de l'IM sur l'accumulation et/ou l'activation des NK consécutives à l'administration de faibles doses d'IL-2. Bien que le nombre absolu de cellules NK ne soit pas augmenté, les proportions de NK parmi les lymphocytes ainsi que les proportions de cellules $CD56^{bright}$, $HLA\text{-}DR^+$ ou $TRAIL^+$ parmi les cellules NK sont augmentées entre 2 et 4 fois après 5 jours d'IL-2. Ces données laissent à penser qu'associer l'IM à l'IL-2 pourrait découpler les effets immunosuppresseurs de l'IL-2 de ses effets immunostimulants en limitant l'activation des lymphocytes Treg tout en conservant l'activation des cellules NK. La combinaison IM + IL-2 semble préférentiellement augmenter la population de cellules NK $CD56^{bright}$ $HLA\text{-}DR^+$. D'après Evans et al., l'expression du marqueur HLA-DR pourrait caractériser un sous-groupe de cellules NK susceptibles de proliférer en présence d'IL-2. Ils montrent en effet que l'incubation *in vitro* de PBMC provenant de volontaires sains avec de l'IL-2 augmente le nombre de cellules NK $HLA\text{-}DR^+$ [323]. Les auteurs suggèrent que cette augmentation ne soit

pas liée à une augmentation de l'expression du marqueur HLA-DR$^+$ mais plutôt à la prolifération d'un précurseur exprimant HLA-DR$^+$. En réponse à l'IL-2 ou à l'IL-15, ces cellules NK HLA-DR$^+$ sont plus efficaces que leurs homologues HLA-DR$^-$ en terme de prolifération et de dégranulation, mais sont équivalentes concernant la sécrétion d'IFN-γ. Conformément à ces résultats, nous avons également observé une augmentation de la capacité de dégranulation des cellules HLA-DR$^+$ mais pas d'augmentation de la sécrétion d'IFN-γ. Plusieurs équipes ont montré que les cellules NK exprimant les molécules CMH-II pourraient représenter un sous-groupe distinct de cellules NK immatures aussi bien dans des modèles murins qu'humains [297,323,324]. Dans l'essai IMAIL-2, nous avons mis en évidence que la combinaison d'IM et d'IL-2 chez des patients atteints de cancer à des stades avancés induit l'expansion d'une population de cellules NK HLA-DR$^+$ possédant une capacité de dégranulation efficace et dont l'expansion est associée à une meilleure survie. D'ailleurs, ces cellules NK exprimant le marqueur HLA-DR pourraient être analogues à la population de cellules IKDC mises en évidence dans un modèle murin [292,298]. Des études supplémentaires restent cependant nécessaires avant de pouvoir confirmer qu'elles correspondent bien au pendant humain des IKDC.

Après une durée moyenne de traitement de 12 semaines, on observe dans l'étude IMAIL-2 une stabilisation de la maladie pour 8 des 17 patients (47%). Dans cette cohorte, l'association IM + IL-2 ne montre donc pas d'effet thérapeutique majeur. Dans le cadre du traitement de tumeurs solides, plusieurs équipes de recherche ont déjà essayé de combiner l'IM à d'autres molécules dont des molécules immunostimulantes ou des chimiothérapies. Généralement mal tolérées, ces combinaisons se sont de plus avérées peu efficaces. Par exemple, dans les carcinomes métastiques à cellules rénales, l'association de l'IM à l'IFN-α augmente significativement les toxicités alors qu'aucune amélioration clinique n'est observée par rapport à l'IFN-α seul [325]. Poursuivre les investigations concernant cette association dans les carcinomes à cellules rénales ne semble donc pas raisonnable. Par contre, tester cette association sur des tumeurs sensibles à l'IM telles que les GIST présente un rationnel plus important. Les GIST sont en effet caractérisées dans près de 90% des cas par une mutation activatrice des gènes KIT ou PDGFRα leur conférant une sensibilité à l'IM [326]. Testée récemment dans une cohorte de 8 patients atteints de GIST au stade III/IV, l'association d'IM avec de fortes doses d'IFN-α2b pégylé (3μg/kg/semaine pendant 4 semaines suivi de 1.5μg/kg/semaine pendant 18 semaines) a montré des bénéfices cliniques très prometteurs puisque le taux de réponse objective – incluant les réponses partielles et complètes – est de

100% avec une médiane de suivie de 3,6 ans [241]. Bien que cette étude reste très préliminaire, les résultats cliniques semblent supérieurs à ceux obtenues avec l'IM en monothérapie et sont associés à une augmentation significative de la réponse Th1 et de l'activation des NK [241]. Malheureusement dans notre étude IMAIL-2, seul un patient atteint de GIST a été inclus, alors que 10 mélanomes métastatiques ont été inclus. Il pourrait donc s'avérer intéressant de tester cette association dans une cohorte de patients atteints de tumeur sensible à l'IM afin de voir si l'IL-2 peut augmenter l'efficacité de l'IM.

En parallèle de cette étude de phase 1, nous avons cherché à mieux caractériser les effets immunomodulateurs de l'IM en étudiant les différents acteurs de l'immunité présents au niveau d'un modèle de tumeur sensible à l'IM : les tumeurs stromales gastro-intestinales. Ainsi, nous avons pu mettre en évidence la présence de LT, de Treg et de cellules NK dans la tumeur primitive dès le diagnostic. Ces LT et notamment les cellules NK semblent jouer un rôle dans l'immunosurveillance naturelle puisqu'au diagnostic, leur densité est corrélée aux marqueurs pronostiques classiques (mutation de l'exon 11 de KIT et score de Miettinen). Le traitement par IM modifie cet infiltrat lymphocytaire : on observe en effet une diminution de l'infiltrat FoxP3$^+$ et une relocalisation des cellules NK au sein de la tumeur. L'infiltrat en LT n'est par contre pas modifié en comparaison à l'infiltrat observé en l'absence de traitement. Suite à un traitement par IM, on observe également une diminution de l'expression des molécules de CMH-I exprimées à la surface des cellules tumorales. La relocalisation des cellules NK et la diminution d'expression des molécules de CMH-I suite à un traitement par IM sont associées à une augmentation de la survie sans progression ; ces données confortent l'idée que les cellules NK sont impliquées dans l'efficacité antitumorale de l'IM.

Si des preuves expérimentales de leur rôle antitumoral ont été établies à maintes reprises [51], plusieurs études décrivent pourtant les cellules NK infiltrant les tumeurs comme rares, anergiques ou n'influençant pas le pronostic de la maladie [300] (**Annexe 3**). Récemment, Sconocchia *et al.* ont mis en évidence l'absence d'infiltrat CD56$^+$ dans plus de 71% des mélanomes, 97% des cancers du sein, 92% des carcinomes à cellules rénales et 92% des carcinomes hépatocellulaires [327]. Dans les cancers bronchiques non à petites cellules, les cellules NK sont rares, majoritairement CD56^{dim} et expriment faiblement les récepteurs activateurs (NKp30, NKp80, CD16, DNAM-1) ; sur le plan fonctionnel, les cellules NK infiltrant les cancers bronchiques non à petites cellules ont des capacités de dégranulation et de sécrétion d'IFN-γ altérées [328]. De même, dans les tumeurs à papillomavirus humain, on observe une diminution d'expression des récepteurs activateurs NKp30 et NKp46 qui est liée à l'infection à papillomavirus humain, à une diminution de cytotoxicité des cellules NK et au

stade avancé de la lésion cancéreuse [329]. Dans le cancer du sein, décrit comme étant contrôlé par les cellules NK [330,331], l'infiltrat tumoral est en effet enrichi en cellules CD56^{bright} mais cet infiltrat exprime faiblement les NCR et est moins cytotoxique que les cellules NK présentes dans les tissus sains [332]. Enfin, la présence d'un infiltrat NK n'est pas corrélée à une amélioration de la clinique dans les cancers bronchiques non à petites cellules [328] et dans les cancers colorectaux [333].

Pourtant, les tumeurs stromales gastro-intestinales ne semblent pas induire cet état d'anergie ou de tolérance des cellules NK. Comme cela a été suggéré dans le cancer du sein et de l'ovaire [332,334], l'exposition chronique à des ligands des récepteurs aux NCR sécrétés par les tumeurs elles-mêmes, pourrait expliquer la diminution d'expression de récepteurs activateurs, et par conséquent perturber les fonctions des cellules NK infiltrant les tumeurs. Au diagnostic, les principaux ligands des NCR ne sont pas exprimés par les cellules des GIST ; cela peut en partie expliquer que l'expression des récepteurs aux NK soit maintenue. Enfin, le profil cytokines/chimiokines que nous avons analysé en multiplex à partir de GIST fraichement extraites (données non publiées) met en évidence la sécrétion importante de SCF (*stem cell factor*) et de SCGF (*stem cell growth factor*) qui peuvent contribuer à l'homéostasie et à la différentiation *in situ* des NK infiltrant la tumeur [335,336].

L'environnement tumoral des GIST est donc favorable à l'activation des cellules NK et un traitement par IM renforce également cette immunosurveillance en contribuant à l'activation des cellules NK. Bien qu'on observe une diminution d'expression des molécules de CMH I à la surface des cellules tumorales, cette propriété de l'IM ne semble pas liée à un effet direct via l'inhibition de l'oncogène KIT présent à la surface des cellules tumorales. En effet, la diminution d'expression des molécules du CMH de classe I observée après un traitement *in vivo* par IM n'est pas retrouvée *in vitro*, que les cellules soient sensibles ou résistantes à l'IM. De même, *in vitro* les capacités de dégranulation et de sécrétion d'IFN-γ par les cellules NK sont identiques qu'elles soient mises en présence de cellules tumorales sensibles ou résistantes à l'IM. D'un autre coté, l'inhibition de l'oncogène KIT par l'IM pourrait moduler le relargage de chimiokines, notamment pendant le dialogue entre les cellules NK et les cellules tumorales exprimant KIT. De manière intéressante, le gradient de Cxcl9 et Cxcl10 est inversé après un traitement par IM ; préférentiellement exprimées en périphérie avant traitement, ces chimiokines sont, après traitement, plus exprimées au niveau des foyers tumoraux. Elles pourraient donc contribuer à la rétention des cellules NK au niveau tumoral. Enfin, l'inhibition du signal oncogénique KIT, en diminuant l'expression de

l'enzyme IDO et en diminuant l'accumulation intra-tumorale en cellules FoxP3$^+$ pourrait également contribuer à favoriser les fonctions effectrices des cellules NK [213,337].

Actuellement, l'IM est indiqué d'une part dans le traitement des patients adultes atteints de GIST KIT$^+$ non résécables et/ou métastatiques et d'autre part dans le traitement adjuvant des patients adultes présentant un risque significatif de rechute après résection d'une tumeur stromale gastro-intestinale GIST KIT$^+$. L'autorisation de mise sur le marché précise par contre que les patients présentant un faible ou un très faible risque ne doivent pas être traités. Actuellement, les recommandations concernant l'évaluation du risque de rechute des GIST localisées prennent en compte cinq paramètres : la taille de la tumeur, sa localisation, son index mitotique – qui a eux trois permettent d'établir le score de Miettinen [177] –, son statut mutationnel, et depuis peu la survenue d'une rupture au cours de la chirurgie [338]. Si ces différents paramètres permettent d'avoir une idée plus précise du risque de récidive pour les GIST localisées, il persiste tout de même de nombreuses interrogations sur la nécessité d'instaurer un traitement adjuvant par IM après chirurgie. D'autres marqueurs sont donc en cours d'évaluation ; ils prennent notamment en compte l'accumulation d'aberrations chromosomiques, l'inactivation du gène suppresseur de tumeur CDKN2A et doivent permettre de mieux définir le risque de récidive tumorale et la nécessité d'instaurer un traitement par IM. Dans ce contexte, nous avons évalué différents marqueurs immunitaires susceptibles d'avoir une valeur pronostique dans l'évolution des GIST. Contrairement au STS, les tumeurs stromales gastro-intestinales sont fortement infiltrées par des LT (CD4$^+$ et CD8$^+$) et des NK alors qu'elles le sont faiblement par des LT CD4$^+$Foxp3$^+$. L'accumulation des cellules NK au niveau tumoral pourrait, au moins en partie, être dictée par les caractéristiques intrinsèques de la tumeur : le nombre de cellules NK est en effet corrélé au score de Miettinen et au statut mutationnel de KIT. Néanmoins, l'infiltrat en cellules NK représente un facteur pronostic indépendant et qui, combiné au score de Miettinen améliore la performance pronostique. Dans une étude précédente, nous avions montré le caractère NKp30 dépendant de cette maladie ; le récepteur activateur NKp30 est en effet le seul dont l'expression est diminuée aussi bien au niveau des NK tumoraux qu'au niveau des NK circulants. De plus, le profil d'expression des isoformes de ce récepteur est un marqueur prédictif de la réponse à l'IM dans les GIST. En plus des cellules NK, les LT semblent également jouer un rôle important dans l'immunosurveillance des GIST. Au diagnostic, l'infiltrat en cellules Foxp3 est corrélé avec le score de Miettinen. Après traitement par IM, l'infiltrat en cellules Foxp3 diminue fortement. Ces observations corroborent les données de Balachandran et *al.* montrant que le traitement par IM s'accompagne d'une apoptose des

lymphocytes Treg induite par une diminution de l'enzyme IDO [213]. Dans notre cohorte, nous avons testé la valeur pronostique de l'infiltrat intratumoral Foxp3 ; ce paramètre n'est pas associé à la survie sans progression dans les GIST localisées. Cependant, on observe un impact de l'infiltrat $Foxp3^+$ et $NKp46^+$ dans le sous-groupe de patients traités par IM. En effet, l'accumulation de cellules $Foxp3^+$ ou la diminution de cellules $NKp46^+$ a une valeur prédictive négative de la réponse au traitement. Etant donné que i) l'infiltrat en LT et l'infiltrat en NK ne sont pas localisés dans les mêmes zones tumorales, ii) qu'ils ne sont pas corrélés en terme de fréquence et iii) qu'ils ajoutent une valeur pronostique aux marqueurs pronostiques connus (score de Miettinen et mutation de l'exon 11 du gène KIT), nous pensons qu'ils doivent être considérés comme des facteurs indépendants influençant l'histoire de la maladie des GIST localisées. Il est maintenant nécessaire de valider ces données dans une cohorte indépendante et d'effectif plus important.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Si dans l'essai clinique IMAIL-2, combiner l'IL-2 à l'IM n'a pas montré d'efficacité clinique majeure, cette association n'en reste pas moins intéressante. Elle permet d'une part d'augmenter significativement l'exposition systémique à l'IM. Et d'autre part, elle augmente une population de cellules NK HLA-DR$^+$ possédant des capacités de dégranulation plus importantes après exposition à ces deux molécules. Cette sous-population de cellules NK s'avère particulièrement intéressante dans la mesure où leur expansion est positivement corrélée à la réponse clinique. L'étude de leur profil transcriptionnel, de leur capacité de migration et de présentation de l'antigène devrait nous permettre de savoir si ces cellules NK HLA-DR$^+$ correspondent bien à l'équivalent des IKDC décrites dans un modèle murin [292,298].

Sur le plan pharmacologique, il serait intéressant de comprendre les mécanismes impliqués dans l'augmentation de l'exposition à l'IM suite à l'administration d'IL-2. Un des mécanismes de résistance secondaire observé au cours d'un traitement par IM est la modulation des paramètres pharmacocinétiques. Ceci a notamment été montré dans une cohorte de patients atteints de GIST. Après plus d'un an de traitement, la clairance de l'IM est augmentée d'environ 33% et l'exposition systémique diminuée d'environ 42% par rapport au début du traitement [312]. Or une relation entre les paramètres pharmacocinétiques et l'efficacité des médicaments est observée à la fois dans la LMC [339-341] et dans les GIST [342] ; les concentrations résiduelles d'IM sont plus élevées chez les patients bons répondeurs que chez les patients moins bons répondeurs. Comprendre comment l'IL-2 augmente l'exposition à l'IM pourrait donc ouvrir la voie à de nouvelles stratégies thérapeutiques permettant de palier aux résistances secondaires de type pharmacocinétique.

Il semble également intéressant de continuer les investigations concernant cette association en vue de la tester dans des pathologies présentant des mutations ciblées par l'IM telles que le GIST ou la LMC. Pour plusieurs raisons, le GIST est un modèle tumoral particulièrement pertinent pour évaluer les bénéfices de cette association. (i) L'IM s'est imposé comme le traitement de référence de cette pathologie. (ii) Les cellules NK jouent un rôle majeur dans le contrôle de cette pathologie [204-206]. (iii) Associer l'IM à une immunothérapie (dans ce cas l'IFN-α) a très récemment suscité un intérêt important en montrant une augmentation significative de la réponse Th1 et de l'activation des NK associée à des bénéfices cliniques très prometteurs [241].

L'étude des cellules immunitaires présentes au niveau des tumeurs stromales gastro-intestinales nous a permis de mettre en évidence la valeur pronostique des cellules NK et des

LT. Mais si l'infiltrat en cellules NK et en LT est pronostique dans les GIST localisées, l'étude de ces paramètres immunitaires perd de son intérêt dans les GIST métastatiques. En effet, en situation métastatique, il devient de plus en plus rare d'avoir accès à la tumeur primitive dans la mesure où le traitement de référence n'est plus la chirurgie mais l'IM. Dans le cas particulier des GIST métastatiques, développer des marqueurs sériques reflétant le degré d'activation des cellules NK ou LT serait donc plus pertinent. Parmi les marqueurs sériques relevant, nous avons commencé à en étudier deux : les formes solubles de B7-H6 – ligand du récepteur NKp30/NCR3 – et MICA (*soluble major histocompatibility complex class I-related chain A protein*) qui diminuent l'expression du récepteur NKG2D à la surface des NK et des LT.

REFERENCES

1. Schreiber, R. D., Old, L. J. & Smyth, M. J. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* **331,** 1565–1570 (2011).
2. Smyth, M. J. *et al.* Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. *J. Exp. Med.* **192,** 755–760 (2000).
3. van den Broek, M. E. *et al.* Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice. *J. Exp. Med.* **184,** 1781–1790 (1996).
4. Cretney, E. *et al.* Increased susceptibility to tumor initiation and metastasis in TNF-related apoptosis-inducing ligand-deficient mice. *J. Immunol.* **168,** 1356–1361 (2002).
5. Zerafa, N. *et al.* Cutting edge: TRAIL deficiency accelerates hematological malignancies. *J. Immunol.* **175,** 5586–5590 (2005).
6. Kaplan, D. H. *et al.* Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95,** 7556–7561 (1998).
7. Bromberg, J. F., Horvath, C. M., Wen, Z., Schreiber, R. D. & Darnell, J. E. Transcriptionally active Stat1 is required for the antiproliferative effects of both interferon alpha and interferon gamma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93,** 7673–7678 (1996).
8. Xu, X., Fu, X. Y., Plate, J. & Chong, A. S. IFN-gamma induces cell growth inhibition by Fas-mediated apoptosis: requirement of STAT1 protein for up-regulation of Fas and FasL expression. *Cancer Res.* **58,** 2832–2837 (1998).
9. Dunn, G. P. *et al.* A critical function for type I interferons in cancer immunoediting. *Nat. Immunol.* **6,** 722–729 (2005).
10. Swann, J. B. *et al.* Type I IFN contributes to NK cell homeostasis, activation, and antitumor function. *J. Immunol.* **178,** 7540–7549 (2007).
11. Le Bon, A. *et al.* Cross-priming of CD8+ T cells stimulated by virus-induced type I interferon. *Nat. Immunol.* **4,** 1009–1015 (2003).
12. Le Bon, A. *et al.* Type i interferons potently enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo. *Immunity* **14,** 461–470 (2001).
13. Marrack, P., Kappler, J. & Mitchell, T. Type I interferons keep activated T cells alive. *J. Exp. Med.* **189,** 521–530 (1999).
14. Sato, K. *et al.* Antiviral response by natural killer cells through TRAIL gene induction by IFN-alpha/beta. *Eur. J. Immunol.* **31,** 3138–3146 (2001).
15. Kerbel, R. & Folkman, J. Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat. Rev. Cancer* **2,** 727–739 (2002).
16. Vesely, M. D., Kershaw, M. H., Schreiber, R. D. & Smyth, M. J. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu. Rev. Immunol.* **29,** 235–271 (2011).
17. Shankaran, V. *et al.* IFNgamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* **410,** 1107–1111 (2001).
18. Smyth, M. J., Crowe, N. Y. & Godfrey, D. I. NK cells and NKT cells collaborate in host protection from methylcholanthrene-induced fibrosarcoma. *Int. Immunol.* **13,** 459–463 (2001).
19. Girardi, M. *et al.* Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells. *Science* **294,** 605–609 (2001).
20. Swann, J. B. *et al.* Type I natural killer T cells suppress tumors caused by p53 loss in mice. *Blood* **113,** 6382–6385 (2009).

21. Smyth, M. J. *et al.* Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. *J. Exp. Med.* **191,** 661–668 (2000).
22. Crowe, N. Y., Smyth, M. J. & Godfrey, D. I. A critical role for natural killer T cells in immunosurveillance of methylcholanthrene-induced sarcomas. *J. Exp. Med.* **196,** 119–127 (2002).
23. Oppenheim, D. E. *et al.* Sustained localized expression of ligand for the activating NKG2D receptor impairs natural cytotoxicity in vivo and reduces tumor immunosurveillance. *Nat. Immunol.* **6,** 928–937 (2005).
24. Simson, L. *et al.* Regulation of carcinogenesis by IL-5 and CCL11: a potential role for eosinophils in tumor immune surveillance. *J. Immunol.* **178,** 4222–4229 (2007).
25. Loser, K. *et al.* An important role of CD80/CD86-CTLA-4 signaling during photocarcinogenesis in mice. *J. Immunol.* **174,** 5298–5305 (2005).
26. Street, S. E., Cretney, E. & Smyth, M. J. Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. *Blood* **97,** 192–197 (2001).
27. Liu, J., Xiang, Z. & Ma, X. Role of IFN regulatory factor-1 and IL-12 in immunological resistance to pathogenesis of N-methyl-N-nitrosourea-induced T lymphoma. *J. Immunol.* **173,** 1184–1193 (2004).
28. Wakita, D. *et al.* IFN-gamma-dependent type 1 immunity is crucial for immunosurveillance against squamous cell carcinoma in a novel mouse carcinogenesis model. *Carcinogenesis* **30,** 1408–1415 (2009).
29. Langowski, J. L. *et al.* IL-23 promotes tumour incidence and growth. *Nature* **442,** 461–465 (2006).
30. Street, S. E. A., Trapani, J. A., MacGregor, D. & Smyth, M. J. Suppression of lymphoma and epithelial malignancies effected by interferon gamma. *J. Exp. Med.* **196,** 129–134 (2002).
31. Street, S. E. A. *et al.* Host perforin reduces tumor number but does not increase survival in oncogene-driven mammary adenocarcinoma. *Cancer Res.* **67,** 5454–5460 (2007).
32. Bellone, M. *et al.* iNKT cells control mouse spontaneous carcinoma independently of tumor-specific cytotoxic T cells. *PLoS ONE* **5,** e8646 (2010).
33. Guerra, N. *et al.* NKG2D-deficient mice are defective in tumor surveillance in models of spontaneous malignancy. *Immunity* **28,** 571–580 (2008).
34. Starzl, T. E., Penn, I. & Halgrimson, C. G. Immunosuppression and malignant neoplasms. *N. Engl. J. Med.* **283,** 934 (1970).
35. Gatti, R. A. & Good, R. A. Occurrence of malignancy in immunodeficiency diseases. A literature review. *Cancer* **28,** 89–98 (1971).
36. Engels, E. A. *et al.* Spectrum of cancer risk among US solid organ transplant recipients. *JAMA* **306,** 1891–1901 (2011).
37. Kirk, G. D. *et al.* HIV infection is associated with an increased risk for lung cancer, independent of smoking. *CLIN INFECT DIS* **45,** 103–110 (2007).
38. Chaturvedi, A. K. *et al.* Elevated risk of lung cancer among people with AIDS. *AIDS* **21,** 207–213 (2007).
39. Kobayashi, N. Malignant neoplasms in registered cases of primary immunodeficiency syndrome. *Jpn. J. Clin. Oncol.* **15 Suppl 1,** 307–312 (1985).
40. Hayashi, T. *et al.* Identification of the NKG2D haplotypes associated with natural cytotoxic activity of peripheral blood lymphocytes and cancer immunosurveillance. *Cancer Res.* **66,** 563–570 (2006).

41. Carrington, M. *et al.* Hierarchy of resistance to cervical neoplasia mediated by combinations of killer immunoglobulin-like receptor and human leukocyte antigen loci. *J. Exp. Med.* **201,** 1069–1075 (2005).
42. Clementi, R. *et al.* A proportion of patients with lymphoma may harbor mutations of the perforin gene. *Blood* **105,** 4424–4428 (2005).
43. Sun, T. *et al.* FASL -844C polymorphism is associated with increased activation-induced T cell death and risk of cervical cancer. *J. Exp. Med.* **202,** 967–974 (2005).
44. Xavier, A. C. & Taub, J. W. Acute leukemia in children with Down syndrome. *Haematologica* **95,** 1043–1045 (2010).
45. Imai, K. *et al.* Clinical course of patients with WASP gene mutations. *Blood* **103,** 456–464 (2004).
46. Taylor, A. M., Metcalfe, J. A., Thick, J. & Mak, Y. F. Leukemia and lymphoma in ataxia telangiectasia. *Blood* **87,** 423–438 (1996).
47. Grulich, A. E., van Leeuwen, M. T., Falster, M. O. & Vajdic, C. M. Incidence of cancers in people with HIV/AIDS compared with immunosuppressed transplant recipients: a meta-analysis. *Lancet* **370,** 59–67 (2007).
48. Vajdic, C. M. *et al.* Cancer incidence before and after kidney transplantation. *JAMA* **296,** 2823–2831 (2006).
49. Moloney, F. J. *et al.* A population-based study of skin cancer incidence and prevalence in renal transplant recipients. *Br. J. Dermatol.* **154,** 498–504 (2006).
50. Chia, J. *et al.* Temperature sensitivity of human perforin mutants unmasks subtotal loss of cytotoxicity, delayed FHL, and a predisposition to cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106,** 9809–9814 (2009).
51. Imai, K., Matsuyama, S., Miyake, S., Suga, K. & Nakachi, K. Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet* **356,** 1795–1799 (2000).
52. Cheever, M. A. *et al.* The prioritization of cancer antigens: a national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research. *Clin. Cancer Res.* **15,** 5323–5337 (2009).
53. Reuschenbach, M., Knebel Doeberitz, von, M. & Wentzensen, N. A systematic review of humoral immune responses against tumor antigens. *Cancer Immunol. Immunother.* **58,** 1535–1544 (2009).
54. Fridman, W.-H., Pagès, F., Sautès-Fridman, C. & Galon, J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat. Rev. Cancer* **12,** 298–306 (2012).
55. Sato, E. *et al.* Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102,** 18538–18543 (2005).
56. Naito, Y. *et al.* CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Res.* **58,** 3491–3494 (1998).
57. Dunn, G. P., Old, L. J. & Schreiber, R. D. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* **21,** 137–148 (2004).
58. Ochsenbein, A. F. Immunological ignorance of solid tumors. *Springer Semin. Immunopathol.* **27,** 19–35 (2005).
59. So, T. *et al.* Haplotype loss of HLA class I antigen as an escape mechanism from immune attack in lung cancer. *Cancer Res.* **65,** 5945–5952 (2005).
60. Huang, Y., Obholzer, N., Fayad, R. & Qiao, L. Turning on/off tumor-specific CTL response during progressive tumor growth. *J. Immunol.* **175,** 3110–3116 (2005).
61. Hicklin, D. J. *et al.* beta2-Microglobulin mutations, HLA class I antigen loss, and tumor progression in melanoma. *J. Clin. Invest.* **101,** 2720–2729 (1998).

62. Zhou, G., Lu, Z., McCadden, J. D., Levitsky, H. I. & Marson, A. L. Reciprocal changes in tumor antigenicity and antigen-specific T cell function during tumor progression. *J. Exp. Med.* **200,** 1581–1592 (2004).
63. Atkins, D. *et al.* MHC class I antigen processing pathway defects, ras mutations and disease stage in colorectal carcinoma. *Int. J. Cancer* **109,** 265–273 (2004).
64. Medema, J. P. *et al.* Blockade of the granzyme B/perforin pathway through overexpression of the serine protease inhibitor PI-9/SPI-6 constitutes a mechanism for immune escape by tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98,** 11515–11520 (2001).
65. Giovarelli, M. *et al.* A 'stealth effect': adenocarcinoma cells engineered to express TRAIL elude tumor-specific and allogeneic T cell reactions. *J. Immunol.* **163,** 4886–4893 (1999).
66. Chahlavi, A. *et al.* Glioblastomas induce T-lymphocyte death by two distinct pathways involving gangliosides and CD70. *Cancer Res.* **65,** 5428–5438 (2005).
67. Dong, H. *et al.* Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat. Med.* **8,** 793–800 (2002).
68. Hahne, M. *et al.* Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science* **274,** 1363–1366 (1996).
69. Mellado, M., de Ana, A. M., Moreno, M. C., Martínez, C. & Rodríguez-Frade, J. M. A potential immune escape mechanism by melanoma cells through the activation of chemokine-induced T cell death. *Curr. Biol.* **11,** 691–696 (2001).
70. Agrawal, B., Krantz, M. J., Reddish, M. A. & Longenecker, B. M. Cancer-associated MUC1 mucin inhibits human T-cell proliferation, which is reversible by IL-2. *Nat. Med.* **4,** 43–49 (1998).
71. Bronte, V. & Zanovello, P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat. Rev. Immunol.* **5,** 641–654 (2005).
72. Uyttenhove, C. *et al.* Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat. Med.* **9,** 1269–1274 (2003).
73. Terness, P. *et al.* Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. *J. Exp. Med.* **196,** 447–457 (2002).
74. Youn, J.-I. & Gabrilovich, D. I. The biology of myeloid-derived suppressor cells: the blessing and the curse of morphological and functional heterogeneity. *Eur. J. Immunol.* **40,** 2969–2975 (2010).
75. Sica, A. *et al.* Autocrine production of IL-10 mediates defective IL-12 production and NF-kappa B activation in tumor-associated macrophages. *J. Immunol.* **164,** 762–767 (2000).
76. Leek, R. D. *et al.* Relation of hypoxia-inducible factor-2 alpha (HIF-2 alpha) expression in tumor-infiltrative macrophages to tumor angiogenesis and the oxidative thymidine phosphorylase pathway in Human breast cancer. *Cancer Res.* **62,** 1326–1329 (2002).
77. Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P. & Sica, A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* **23,** 549–555 (2002).
78. Pinzon-Charry, A. *et al.* A population of HLA-DR+ immature cells accumulates in the blood dendritic cell compartment of patients with different types of cancer. *Neoplasia* **7,** 1112–1122 (2005).
79. Almand, B. *et al.* Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. *J. Immunol.* **166,** 678–689 (2001).

80. Bates, G. J. *et al.* Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *Journal of Clinical Oncology* **24,** 5373–5380 (2006).
81. Gobert, M. *et al.* Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. *Cancer Res.* **69,** 2000–2009 (2009).
82. Curiel, T. J. *et al.* Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat. Med.* **10,** 942–949 (2004).
83. Shimizu, K. *et al.* Tumor-infiltrating Foxp3+ regulatory T cells are correlated with cyclooxygenase-2 expression and are associated with recurrence in resected non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* **5,** 585–590 (2010).
84. Petersen, R. P. *et al.* Tumor infiltrating Foxp3+ regulatory T-cells are associated with recurrence in pathologic stage I NSCLC patients. *Cancer* **107,** 2866–2872 (2006).
85. Fu, J. *et al.* Increased regulatory T cells correlate with CD8 T-cell impairment and poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *Gastroenterology* **132,** 2328–2339 (2007).
86. Gao, Q. *et al.* Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection. *Journal of Clinical Oncology* **25,** 2586–2593 (2007).
87. Zhang, Y.-L. *et al.* Different subsets of tumor infiltrating lymphocytes correlate with NPC progression in different ways. *Mol. Cancer* **9,** 4 (2010).
88. Badoual, C. *et al.* Prognostic value of tumor-infiltrating CD4+ T-cell subpopulations in head and neck cancers. *Clin. Cancer Res.* **12,** 465–472 (2006).
89. Winerdal, M. E. *et al.* FOXP3 and survival in urinary bladder cancer. *BJU Int.* **108,** 1672–1678 (2011).
90. Milne, K. *et al.* Systematic analysis of immune infiltrates in high-grade serous ovarian cancer reveals CD20, FoxP3 and TIA-1 as positive prognostic factors. *PLoS ONE* **4,** e6412 (2009).
91. Terabe, M. & Berzofsky, J. A. Immunoregulatory T cells in tumor immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **16,** 157–162 (2004).
92. Willimsky, G. & Blankenstein, T. Sporadic immunogenic tumours avoid destruction by inducing T-cell tolerance. *Nature* **437,** 141–146 (2005).
93. Qin, Z. & Blankenstein, T. A cancer immunosurveillance controversy. *Nat. Immunol.* **5,** 3–4– author reply 4–5 (2004).
94. Coley, W. B. *The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893. Clin. Orthop. Relat. Res.* 3–11 (1991).
95. Meyer, J.-P., Persad, R. & Gillatt, D. A. Use of bacille Calmette-Guérin in superficial bladder cancer. *Postgrad Med J* **78,** 449–454 (2002).
96. Negrier, S. *et al.* Recombinant human interleukin-2, recombinant human interferon alfa-2a, or both in metastatic renal-cell carcinoma. Groupe Français d'Immunothérapie. *N. Engl. J. Med.* **338,** 1272–1278 (1998).
97. Cartron, G., Watier, H., Golay, J. & Solal-Celigny, P. From the bench to the bedside: ways to improve rituximab efficacy. *Blood* **104,** 2635–2642 (2004).
98. Gelderman, K. A., Tomlinson, S., Ross, G. D. & Gorter, A. Complement function in mAb-mediated cancer immunotherapy. *Trends Immunol.* **25,** 158–164 (2004).
99. Abès, R., Gélizé, E., Fridman, W.-H. & Teillaud, J.-L. Long-lasting antitumor protection by anti-CD20 antibody through cellular immune response. *Blood* **116,** 926–934 (2010).

100. Robert, C. *et al.* Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N. Engl. J. Med.* **364,** 2517–2526 (2011).
101. Tseng, S. Y. *et al.* B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. *J. Exp. Med.* **193,** 839–846 (2001).
102. Wang, L. *et al.* Programmed death 1 ligand signaling regulates the generation of adaptive Foxp3+CD4+ regulatory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105,** 9331–9336 (2008).
103. 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.* **99,** 12293–12297 (2002).
104. Tsushima, F. *et al.* Interaction between B7-H1 and PD-1 determines initiation and reversal of T-cell anergy. *Blood* **110,** 180–185 (2007).
105. Topalian, S. L. *et al.* Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N. Engl. J. Med.* **366,** 2443–2454 (2012).
106. Brahmer, J. R. *et al.* Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N. Engl. J. Med.* **366,** 2455–2465 (2012).
107. Mulé, J. J., Shu, S., Schwarz, S. L. & Rosenberg, S. A. Adoptive immunotherapy of established pulmonary metastases with LAK cells and recombinant interleukin-2. *Science* **225,** 1487–1489 (1984).
108. Rosenberg, S. A., Spiess, P. & Lafreniere, R. A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. *Science* **233,** 1318–1321 (1986).
109. Rosenberg, S. A. *et al.* Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2. *J. Natl. Cancer Inst.* **86,** 1159–1166 (1994).
110. Atkins, M. B. *et al.* High-dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993. *J. Clin. Oncol.* **17,** 2105–2116 (1999).
111. Dudley, M. E. *et al.* Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* **23,** 2346–2357 (2005).
112. Rosenberg, S. A., Restifo, N. P., Yang, J. C., Morgan, R. A. & Dudley, M. E. Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **8,** 299–308 (2008).
113. Dudley, M. E. *et al.* Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* **298,** 850–854 (2002).
114. Kantoff, P. W. *et al.* Overall survival analysis of a phase II randomized controlled trial of a Poxviral-based PSA-targeted immunotherapy in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Journal of Clinical Oncology* **28,** 1099–1105 (2010).
115. Vansteenkiste, J. *et al.* Emerging Therapeutic Targets in Non-Small Cell Lung Cancer. *ASCO Annual Meeting* (2007). doi:10.1513/pats.200808-099LC
116. Walter, S. *et al.* Multipeptide immune response to cancer vaccine IMA901 after single-dose cyclophosphamide associates with longer patient survival. *Nat. Med.* (2012). doi:10.1038/nm.2883
117. Small, E. J. *et al.* Placebo-controlled phase III trial of immunologic therapy with sipuleucel-T (APC8015) in patients with metastatic, asymptomatic hormone refractory prostate cancer. *Journal of Clinical Oncology* **24,** 3089–3094 (2006).
118. Kantoff, P. W. *et al.* Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N. Engl. J. Med.* **363,** 411–422 (2010).

119. Brichard, V. G. & Lejeune, D. GSK's antigen-specific cancer immunotherapy programme: pilot results leading to Phase III clinical development. *Vaccine* **25 Suppl 2,** B61–71 (2007).
120. Mittendorf, E. A. *et al.* Clinical trial results of the HER-2/neu (E75) vaccine to prevent breast cancer recurrence in high-risk patients: from US Military Cancer Institute Clinical Trials Group Study I-01 and I-02. *Cancer* **118,** 2594–2602 (2012).
121. Kelland, L. R. Of mice and men: values and liabilities of the athymic nude mouse model in anticancer drug development. *European Journal of Cancer* **40,** 827–836 (2004).
122. Schwartz, H. S. & Grindey, G. B. Adriamycin and daunorubicin: a comparison of antitumor activities and tissue uptake in mice following immunosuppression. *Cancer Res.* **33,** 1837–1844 (1973).
123. Galluzzi, L., Senovilla, L., Zitvogel, L. & Kroemer, G. The secret ally: immunostimulation by anticancer drugs. *Nature Reviews Drug Discovery* **11,** 215–233 (2012).
124. Savill, J. & Fadok, V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* **407,** 784–788 (2000).
125. Ravichandran, K. S. Beginnings of a good apoptotic meal: the find-me and eat-me signaling pathways. *Immunity* **35,** 445–455 (2011).
126. Galluzzi, L. *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death Differ.* **16,** 1093–1107 (2009).
127. Casares, N. *et al.* Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death. *J. Exp. Med.* **202,** 1691–1701 (2005).
128. Locher, C. *et al.* Desirable cell death during anticancer chemotherapy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1209,** 99–108 (2010).
129. Obeid, M. *et al.* Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat. Med.* **13,** 54–61 (2007).
130. Apetoh, L. *et al.* Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat. Med.* **13,** 1050–1059 (2007).
131. Ghiringhelli, F. *et al.* Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors. *Nat. Med.* **15,** 1170–1178 (2009).
132. Tesniere, A. *et al.* Immunogenic death of colon cancer cells treated with oxaliplatin. *Oncogene* **29,** 482–491 (2010).
133. Ma, Y. *et al.* Contribution of IL-17-producing gamma delta T cells to the efficacy of anticancer chemotherapy. *J. Exp. Med.* **208,** 491–503 (2011).
134. Mattarollo, S. R. *et al.* Pivotal role of innate and adaptive immunity in anthracycline chemotherapy of established tumors. *Cancer Res.* **71,** 4809–4820 (2011).
135. Ghiringhelli, F. *et al.* CD4+CD25+ regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative. *Eur. J. Immunol.* **34,** 336–344 (2004).
136. Viaud, S. *et al.* Cyclophosphamide induces differentiation of Th17 cells in cancer patients. *Cancer Res.* **71,** 661–665 (2011).
137. Ghiringhelli, F. *et al.* Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4+CD25+ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients. *Cancer Immunol. Immunother.* **56,** 641–648 (2007).
138. Guerriero, J. L. *et al.* DNA alkylating therapy induces tumor regression through an HMGB1-mediated activation of innate immunity. *J. Immunol.* **186,** 3517–3526 (2011).

139. Joensuu, H. *et al.* Effect of the tyrosine kinase inhibitor STI571 in a patient with a metastatic gastrointestinal stromal tumor. *N. Engl. J. Med.* **344,** 1052–1056 (2001).
140. Büschenfelde, zum, C. M., Hermann, C., Schmidt, B., Peschel, C. & Bernhard, H. Antihuman epidermal growth factor receptor 2 (HER2) monoclonal antibody trastuzumab enhances cytolytic activity of class I-restricted HER2-specific T lymphocytes against HER2-overexpressing tumor cells. *Cancer Res.* **62,** 2244–2247 (2002).
141. Arnould, L. *et al.* Trastuzumab-based treatment of HER2-positive breast cancer: an antibody-dependent cellular cytotoxicity mechanism? *British Journal of Cancer* **94,** 259–267 (2006).
142. Pollack, B. P., Sapkota, B. & Cartee, T. V. Epidermal growth factor receptor inhibition augments the expression of MHC class I and II genes. *Clin. Cancer Res.* **17,** 4400–4413 (2011).
143. Adotevi, O. *et al.* A decrease of regulatory T cells correlates with overall survival after sunitinib-based antiangiogenic therapy in metastatic renal cancer patients. *J. Immunother.* **33,** 991–998 (2010).
144. Ko, J. S. *et al.* Sunitinib mediates reversal of myeloid-derived suppressor cell accumulation in renal cell carcinoma patients. *Clin. Cancer Res.* **15,** 2148–2157 (2009).
145. Finke, J. H. *et al.* Sunitinib reverses type-1 immune suppression and decreases T-regulatory cells in renal cell carcinoma patients. *Clin. Cancer Res.* **14,** 6674–6682 (2008).
146. Desar, I. M. E. *et al.* Sorafenib reduces the percentage of tumour infiltrating regulatory T cells in renal cell carcinoma patients. *Int. J. Cancer* **129,** 507–512 (2011).
147. Xin, H. *et al.* Sunitinib inhibition of Stat3 induces renal cell carcinoma tumor cell apoptosis and reduces immunosuppressive cells. *Cancer Res.* **69,** 2506–2513 (2009).
148. Hipp, M. M. *et al.* Sorafenib, but not sunitinib, affects function of dendritic cells and induction of primary immune responses. *Blood* **111,** 5610–5620 (2008).
149. Wong, S. & Witte, O. N. The BCR-ABL story: bench to bedside and back. *Annu. Rev. Immunol.* **22,** 247–306 (2004).
150. Vardiman, J. W. Chronic myelogenous leukemia, BCR-ABL1+. *Am. J. Clin. Pathol.* **132,** 250–260 (2009).
151. Bartram, C. R. *et al.* Translocation of c-ab1 oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature* **306,** 277–280 (1983).
152. Heisterkamp, N. *et al.* Localization of the c-ab1 oncogene adjacent to a translocation break point in chronic myelocytic leukaemia. *Nature* **306,** 239–242 (1983).
153. Groffen, J. *et al.* Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell* **36,** 93–99 (1984).
154. Lugo, T. G., Pendergast, A. M., Muller, A. J. & Witte, O. N. Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science* **247,** 1079–1082 (1990).
155. Pear, W. S. *et al.* Efficient and rapid induction of a chronic myelogenous leukemia-like myeloproliferative disease in mice receiving P210 bcr/abl-transduced bone marrow. *Blood* **92,** 3780–3792 (1998).
156. Druker, B. J. *et al.* Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat. Med.* **2,** 561–566 (1996).
157. Schindler, T. *et al.* Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science* **289,** 1938–1942 (2000).

158. Nagar, B. *et al.* Crystal structures of the kinase domain of c-Abl in complex with the small molecule inhibitors PD173955 and imatinib (STI-571). *Cancer Res.* **62,** 4236–4243 (2002).
159. Fabbro, D. BCR-ABL signaling: A new STATus in CML. *nature chemical biology* **8,** 228–229 (2012).
160. Corless, C. L., Fletcher, J. A. & Heinrich, M. C. Biology of gastrointestinal stromal tumors. *J. Clin. Oncol.* **22,** 3813–3825 (2004).
161. Went, P. T. *et al.* Prevalence of KIT expression in human tumors. *J. Clin. Oncol.* **22,** 4514–4522 (2004).
162. Capdeville, R., Buchdunger, E., Zimmermann, J. & Matter, A. Glivec (STI571, imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug. *Nature Reviews Drug Discovery* **1,** 493–502 (2002).
163. Shimizu, A. *et al.* The dermatofibrosarcoma protuberans-associated collagen type Ialpha1/platelet-derived growth factor (PDGF) B-chain fusion gene generates a transforming protein that is processed to functional PDGF-BB. *Cancer Res.* **59,** 3719–3723 (1999).
164. Nistér, M., Claesson-Welsh, L., Eriksson, A., Heldin, C. H. & Westermark, B. Differential expression of platelet-derived growth factor receptors in human malignant glioma cell lines. *J. Biol. Chem.* **266,** 16755–16763 (1991).
165. O'Brien, S. G. *et al.* Effects of imatinib mesylate (STI571, Glivec) on the pharmacokinetics of simvastatin, a cytochrome p450 3A4 substrate, in patients with chronic myeloid leukaemia. *British Journal of Cancer* **89,** 1855–1859 (2003).
166. O'Brien, S. G. *et al.* Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* **348,** 994–1004 (2003).
167. Druker, B. J. *Perspectives on the development of imatinib and the future of cancer research. Nat. Med.* **15,** 1149–1152 (Nature Medicine, 2009).
168. Monges, G. *et al.* The estimated incidence of gastrointestinal stromal tumors in France. Results of PROGIST study conducted among pathologists. *Bull Cancer* **97,** E16–22 (2010).
169. Nilsson, B. *et al.* Gastrointestinal stromal tumors: the incidence, prevalence, clinical course, and prognostication in the preimatinib mesylate era--a population-based study in western Sweden. *Cancer* **103,** 821–829 (2005).
170. Besmer, P. *et al.* A new acute transforming feline retrovirus and relationship of its oncogene v-kit with the protein kinase gene family. *Nature* **320,** 415–421 (1986).
171. Hirota, S. *et al.* Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* **279,** 577–580 (1998).
172. Rubin, B. P. *et al.* KIT activation is a ubiquitous feature of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res.* **61,** 8118–8121 (2001).
173. Heinrich, M. C. *et al.* PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science* **299,** 708–710 (2003).
174. Medeiros, F. *et al.* KIT-negative gastrointestinal stromal tumors: proof of concept and therapeutic implications. *Am. J. Surg. Pathol.* **28,** 889–894 (2004).
175. Buchdunger, E. *et al.* Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **295,** 139–145 (2000).
176. Verweij, J. *et al.* Progression-free survival in gastrointestinal stromal tumours with high-dose imatinib: randomised trial. *Lancet* **364,** 1127–1134 (2004).

177. Miettinen, M., Sobin, L. H. & Lasota, J. Gastrointestinal stromal tumors of the stomach: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 1765 cases with long-term follow-up. *Am. J. Surg. Pathol.* **29,** 52–68 (2005).
178. Van Glabbeke, M. *et al.* Predicting toxicities for patients with advanced gastrointestinal stromal tumours treated with imatinib: a study of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer, the Italian Sarcoma Group, and the Australasian Gastro-Intestinal Trials Group (EORTC-ISG-AGITG). *European Journal of Cancer* **42,** 2277–2285 (2006).
179. Gotlib, J. *et al.* The FIP1L1-PDGFRalpha fusion tyrosine kinase in hypereosinophilic syndrome and chronic eosinophilic leukemia: implications for diagnosis, classification, and management. *Blood* **103,** 2879–2891 (2004).
180. Cools, J. *et al.* A tyrosine kinase created by fusion of the PDGFRA and FIP1L1 genes as a therapeutic target of imatinib in idiopathic hypereosinophilic syndrome. *N. Engl. J. Med.* **348,** 1201–1214 (2003).
181. Gleich, G. J., Leiferman, K. M., Pardanani, A., Tefferi, A. & Butterfield, J. H. Treatment of hypereosinophilic syndrome with imatinib mesilate. *Lancet* **359,** 1577–1578 (2002).
182. McArthur, G. A. Molecular targeting of dermatofibrosarcoma protuberans: a new approach to a surgical disease. *J Natl Compr Canc Netw* **5,** 557–562 (2007).
183. Sjöblom, T. *et al.* Growth inhibition of dermatofibrosarcoma protuberans tumors by the platelet-derived growth factor receptor antagonist STI571 through induction of apoptosis. *Cancer Res.* **61,** 5778–5783 (2001).
184. McArthur, G. A. *et al.* Molecular and clinical analysis of locally advanced dermatofibrosarcoma protuberans treated with imatinib: Imatinib Target Exploration Consortium Study B2225. *J. Clin. Oncol.* **23,** 866–873 (2005).
185. Rubin, B. P. *et al.* Molecular targeting of platelet-derived growth factor B by imatinib mesylate in a patient with metastatic dermatofibrosarcoma protuberans. *J. Clin. Oncol.* **20,** 3586–3591 (2002).
186. Maki, R. G., Awan, R. A., Dixon, R. H., Jhanwar, S. & Antonescu, C. R. Differential sensitivity to imatinib of 2 patients with metastatic sarcoma arising from dermatofibrosarcoma protuberans. *Int. J. Cancer* **100,** 623–626 (2002).
187. Baars, A. & Pinedo, H. M. [Good response to treatment with the selective tyrosine-kinase inhibitor imatinib in a patient with metastatic dermatofibrosarcoma protuberans]. *Ned Tijdschr Geneeskd* **147,** 2072–2076 (2003).
188. Mizutani, K. *et al.* Imatinib mesylate inhibits the growth of metastatic lung lesions in a patient with dermatofibrosarcoma protuberans. *Br. J. Dermatol.* **151,** 235–237 (2004).
189. Labropoulos, S. V., Fletcher, J. A., Oliveira, A. M., Papadopoulos, S. & Razis, E. D. Sustained complete remission of metastatic dermatofibrosarcoma protuberans with imatinib mesylate. *Anticancer Drugs* **16,** 461–466 (2005).
190. Kasper, B. *et al.* Imatinib mesylate in a patient with metastatic disease originating from a dermatofibrosarcoma protuberans of the scalp. *Anticancer Drugs* **17,** 1223–1225 (2006).
191. Mehrany, K. *et al.* Dermatofibrosarcoma protuberans: a partial response to imatinib therapy. *Dermatol Surg* **32,** 456–459 (2006).
192. Deininger, M., Buchdunger, E. & Druker, B. J. The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. *Blood* **105,** 2640–2653 (2005).
193. Tikkanen, J. M. *et al.* Role of platelet-derived growth factor and vascular endothelial growth factor in obliterative airway disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **174,** 1145–1152 (2006).

194. Savikko, J., Taskinen, E. & Willebrand, Von, E. Chronic allograft nephropathy is prevented by inhibition of platelet-derived growth factor receptor: tyrosine kinase inhibitors as a potential therapy. *Transplantation* **75,** 1147–1153 (2003).
195. Sadanaga, A. *et al.* Amelioration of autoimmune nephritis by imatinib in MRL/lpr mice. *Arthritis Rheum.* **52,** 3987–3996 (2005).
196. Kallio, E. A., Koskinen, P. K., Aavik, E., Buchdunger, E. & Lemström, K. B. Role of platelet-derived growth factor in obliterative bronchiolitis (chronic rejection) in the rat. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **160,** 1324–1332 (1999).
197. Floege, J., Hudkins, K. L., Davis, C. L., Schwartz, S. M. & Alpers, C. E. Expression of PDGF alpha-receptor in renal arteriosclerosis and rejecting renal transplants. *J. Am. Soc. Nephrol.* **9,** 211–223 (1998).
198. Floege, J. & Johnson, R. J. Multiple roles for platelet-derived growth factor in renal disease. *Miner Electrolyte Metab* **21,** 271–282 (1995).
199. Mattiuzzi, G. N. *et al.* Development of Varicella-Zoster virus infection in patients with chronic myelogenous leukemia treated with imatinib mesylate. *Clin. Cancer Res.* **9,** 976–980 (2003).
200. Breccia, M. *et al.* Low incidence rate of opportunistic and viral infections during imatinib treatment in chronic myeloid leukemia patients in early and late chronic phase. *Mediterr J Hematol Infect Dis* **3,** e2011021 (2011).
201. Travi, G. *et al.* The Effect of Imatinib on Cytomegalovirus Reactivation in Hematopoietic Cell Transplantation. *CLIN INFECT DIS* **49,** e120–e123 (2009).
202. Mohty, M. *et al.* Imatinib and plasmacytoid dendritic cell function in patients with chronic myeloid leukemia. *Blood* **103,** 4666–4668 (2004).
203. Sato, N. *et al.* The effects of STI571 on antigen presentation of dendritic cells generated from patients with chronic myelogenous leukemia. *Hematol Oncol* **21,** 67–75 (2003).
204. Borg, C. *et al.* Novel mode of action of c-kit tyrosine kinase inhibitors leading to NK cell-dependent antitumor effects. *J. Clin. Invest.* **114,** 379–388 (2004).
205. Ménard, C. *et al.* Natural killer cell IFN-gamma levels predict long-term survival with imatinib mesylate therapy in gastrointestinal stromal tumor-bearing patients. *Cancer Res.* **69,** 3563–3569 (2009).
206. Delahaye, N. F. *et al.* Alternatively spliced NKp30 isoforms affect the prognosis of gastrointestinal stromal tumors. *Nat. Med.* **17,** 700–707 (2011).
207. Wang, H. *et al.* Imatinib mesylate (STI-571) enhances antigen-presenting cell function and overcomes tumor-induced CD4+ T-cell tolerance. *Blood* **105,** 1135–1143 (2005).
208. Zeng, Y., Graner, M. W., Feng, H., Li, G. & Katsanis, E. Imatinib mesylate effectively combines with chaperone-rich cell lysate-loaded dendritic cells to treat bcr-abl+ murine leukemia. *Int. J. Cancer* **110,** 251–259 (2004).
209. Aswald, J. M., Lipton, J. H., Aswald, S. & Messner, H. A. Increased IFN-gamma synthesis by T cells from patients on imatinib therapy for chronic myeloid leukemia. *Cytokines Cell. Mol. Ther.* **7,** 143–149 (2002).
210. Bocchia, M. *et al.* Effect of a p210 multipeptide vaccine associated with imatinib or interferon in patients with chronic myeloid leukaemia and persistent residual disease: a multicentre observational trial. *Lancet* **365,** 657–662 (2005).
211. Bocchia, M. *et al.* Imatinib does not impair specific antitumor T-cell immunity in patients with chronic myeloid leukemia. *Leukemia* **20,** 142–143 (2006).
212. Chen, C. I.-U., Maecker, H. T. & Lee, P. P. Development and dynamics of robust T-cell responses to CML under imatinib treatment. *Blood* **111,** 5342–5349 (2008).

213. Balachandran, V. P. *et al.* Imatinib potentiates antitumor T cell responses in gastrointestinal stromal tumor through the inhibition of Ido. *Nat. Med.* **17,** 1094–1100 (2011).
214. Catellani, S., Pierri, I., Gobbi, M., Poggi, A. & Zocchi, M. R. Imatinib treatment induces CD5+ B lymphocytes and IgM natural antibodies with anti-leukemic reactivity in patients with chronic myelogenous leukemia. *PLoS ONE* **6,** e18925 (2011).
215. Larmonier, N. *et al.* Imatinib mesylate inhibits CD4+ CD25+ regulatory T cell activity and enhances active immunotherapy against BCR-ABL- tumors. *J. Immunol.* **181,** 6955–6963 (2008).
216. Chen, J. *et al.* Imatinib impairs the proliferation and function of CD4+CD25+ regulatory T cells in a dose-dependent manner. *Int. J. Oncol.* **31,** 1133–1139 (2007).
217. Boissel, N. *et al.* Imatinib mesylate minimally affects bcr-abl+ and normal monocyte-derived dendritic cells but strongly inhibits T cell expansion despite reciprocal dendritic cell-T cell activation. *J. Leukoc. Biol.* **79,** 747–756 (2006).
218. Dietz, A. B. *et al.* Imatinib mesylate inhibits T-cell proliferation in vitro and delayed-type hypersensitivity in vivo. *Blood* **104,** 1094–1099 (2004).
219. Seggewiss, R. *et al.* Imatinib inhibits T-cell receptor-mediated T-cell proliferation and activation in a dose-dependent manner. *Blood* **105,** 2473–2479 (2005).
220. Cwynarski, K. *et al.* Imatinib inhibits the activation and proliferation of normal T lymphocytes in vitro. *Leukemia* **18,** 1332–1339 (2004).
221. Taieb, J., Maruyama, K., Borg, C., Terme, M. & Zitvogel, L. Imatinib mesylate impairs Flt3L-mediated dendritic cell expansion and antitumor effects in vivo. *Blood* **103,** 1966–7– author reply 1967 (2004).
222. Dewar, A. L., Domaschenz, R. M., Doherty, K. V., Hughes, T. P. & Lyons, A. B. Imatinib inhibits the in vitro development of the monocyte/macrophage lineage from normal human bone marrow progenitors. *Leukemia* **17,** 1713–1721 (2003).
223. Dewar, A. L., Doherty, K. V., Hughes, T. P. & Lyons, A. B. Imatinib inhibits the functional capacity of cultured human monocytes. *Immunol. Cell Biol.* **83,** 48–56 (2005).
224. Dewar, A. L. *et al.* Macrophage colony-stimulating factor receptor c-fms is a novel target of imatinib. *Blood* **105,** 3127–3132 (2005).
225. Appel, S. *et al.* Imatinib mesylate affects the development and function of dendritic cells generated from CD34+ peripheral blood progenitor cells. *Blood* **103,** 538–544 (2004).
226. Appel, S. *et al.* Effects of imatinib on monocyte-derived dendritic cells are mediated by inhibition of nuclear factor-kappaB and Akt signaling pathways. *Clin. Cancer Res.* **11,** 1928–1940 (2005).
227. Bartolovic, K. *et al.* Inhibitory effect of imatinib on normal progenitor cells in vitro. *Blood* **103,** 523–529 (2004).
228. Sinai, P. *et al.* Imatinib mesylate inhibits antigen-specific memory CD8 T cell responses in vivo. *J. Immunol.* **178,** 2028–2037 (2007).
229. Hensley, M. L. & Ford, J. M. Imatinib treatment: specific issues related to safety, fertility, and pregnancy. *Semin. Hematol.* **40,** 21–25 (2003).
230. Steegmann, J. L. *et al.* Chronic myeloid leukemia patients resistant to or intolerant of interferon alpha and subsequently treated with imatinib show reduced immunoglobulin levels and hypogammaglobulinemia. *Haematologica* **88,** 762–768 (2003).

231. Ammon, C., Mondal, K., Andreesen, R. & Krause, S. W. Differential expression of the transcription factor NF-kappaB during human mononuclear phagocyte differentiation to macrophages and dendritic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **268,** 99–105 (2000).
232. Pettit, A. R. *et al.* Nuclear localization of RelB is associated with effective antigen-presenting cell function. *J. Immunol.* **159,** 3681–3691 (1997).
233. Leder, C., Ortler, S., Seggewiss, R., Einsele, H. & Wiendl, H. Modulation of T-effector function by imatinib at the level of cytokine secretion. *Exp. Hematol.* **35,** 1266–1271 (2007).
234. Mumprecht, S., Matter, M., Pavelic, V. & Ochsenbein, A. F. Imatinib mesylate selectively impairs expansion of memory cytotoxic T cells without affecting the control of primary viral infections. *Blood* **108,** 3406–3413 (2006).
235. Fernandez, N. C. *et al.* Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nat. Med.* **5,** 405–411 (1999).
236. Ashman, L. K., Cambareri, A. C., To, L. B., Levinsky, R. J. & Juttner, C. A. Expression of the YB5.B8 antigen (c-kit proto-oncogene product) in normal human bone marrow. *Blood* **78,** 30–37 (1991).
237. Orfao, A., Garcia-Montero, A. C., Sanchez, L., Escribano, L.REMA. Recent advances in the understanding of mastocytosis: the role of KIT mutations. *Br. J. Haematol.* **138,** 12–30 (2007).
238. Matos, M. E. *et al.* Expression of a functional c-kit receptor on a subset of natural killer cells. *J. Exp. Med.* **178,** 1079–1084 (1993).
239. Colucci, F. & Di Santo, J. P. The receptor tyrosine kinase c-kit provides a critical signal for survival, expansion, and maturation of mouse natural killer cells. *Blood* **95,** 984–991 (2000).
240. Krishnamoorthy, N. *et al.* Activation of c-Kit in dendritic cells regulates T helper cell differentiation and allergic asthma. *Nat. Med.* **14,** 565–573 (2008).
241. Chen, L. L. *et al.* Exploiting antitumor immunity to overcome relapse and improve remission duration. *Cancer Immunol. Immunother.* (2011). doi:10.1007/s00262-011-1185-1
242. Smyth, M. J., Hayakawa, Y., Takeda, K. & Yagita, H. New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2,** 850–861 (2002).
243. Talmadge, J. E., Meyers, K. M., Prieur, D. J. & Starkey, J. R. Role of NK cells in tumour growth and metastasis in beige mice. *Nature* **284,** 622–624 (1980).
244. Gorelik, E., Wiltrout, R. H., Okumura, K., Habu, S. & Herberman, R. B. Role of NK cells in the control of metastatic spread and growth of tumor cells in mice. *Int. J. Cancer* **30,** 107–112 (1982).
245. Aboud, M., Kingsmore, S. & Segal, S. Role of natural killer cells in controlling local tumor formation and metastatic manifestation of different 3LL Lewis lung carcinoma cell clones. *Nat. Immun.* **12,** 17–24 (1993).
246. Terme, M., Ullrich, E., Delahaye, N. F., Chaput, N. & Zitvogel, L. Natural killer cell-directed therapies: moving from unexpected results to successful strategies. *Nat. Immunol.* **9,** 486–494 (2008).
247. Vivier, E., Ugolini, S., Blaise, D., Chabannon, C. & Brossay, L. Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. *Nat. Rev. Immunol.* **12,** 239–252 (2012).
248. Sutlu, T. & Alici, E. Natural killer cell-based immunotherapy in cancer: current insights and future prospects. *J. Intern. Med.* **266,** 154–181 (2009).

249. Carrega, P. *et al.* Natural killer cells infiltrating human nonsmall-cell lung cancer are enriched in CD56 bright CD16(-) cells and display an impaired capability to kill tumor cells. *Cancer* **112,** 863–875 (2008).
250. Jinushi, M. *et al.* Impairment of natural killer cell and dendritic cell functions by the soluble form of MHC class I-related chain A in advanced human hepatocellular carcinomas. *J. Hepatol.* **43,** 1013–1020 (2005).
251. Taketomi, A. *et al.* Natural killer cell activity in patients with hepatocellular carcinoma: a new prognostic indicator after hepatectomy. *Cancer* **83,** 58–63 (1998).
252. Koda, K. *et al.* Natural killer cell activity and distant metastasis in rectal cancers treated surgically with and without neoadjuvant chemoradiotherapy. *J. Am. Coll. Surg.* **197,** 254–260 (2003).
253. Bauernhofer, T., Kuss, I., Henderson, B., Baum, A. S. & Whiteside, T. L. Preferential apoptosis of CD56dim natural killer cell subset in patients with cancer. *Eur. J. Immunol.* **33,** 119–124 (2003).
254. Mocchegiani, E. *et al.* Role of zinc and alpha2 macroglobulin on thymic endocrine activity and on peripheral immune efficiency (natural killer activity and interleukin 2) in cervical carcinoma. *British Journal of Cancer* **79,** 244–250 (1999).
255. Lutgendorf, S. K. *et al.* Social support, psychological distress, and natural killer cell activity in ovarian cancer. *J. Clin. Oncol.* **23,** 7105–7113 (2005).
256. Tajima, F., Kawatani, T., Endo, A. & Kawasaki, H. Natural killer cell activity and cytokine production as prognostic factors in adult acute leukemia. *Leukemia* **10,** 478–482 (1996).
257. Wakiguchi, H., Kubota, H., Hisakawa, H., Fujieda, M. & Kurashige, T. Defective natural killer cell activity and deficient production of interferon-gamma in children with acute lymphoblastic leukemia. *Acta Paediatr Jpn* **36,** 361–365 (1994).
258. Frassanito, M. A., Silvestris, F., Cafforio, P., Silvestris, N. & Dammacco, F. IgG M-components in active myeloma patients induce a down-regulation of natural killer cell activity. *Int. J. Clin. Lab. Res.* **27,** 48–54 (1997).
259. Konjević, G. *et al.* Low expression of CD161 and NKG2D activating NK receptor is associated with impaired NK cell cytotoxicity in metastatic melanoma patients. *Clin. Exp. Metastasis* **24,** 1–11 (2007).
260. Costello, R. T. *et al.* Defective expression and function of natural killer cell-triggering receptors in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* **99,** 3661–3667 (2002).
261. El-Sherbiny, Y. M. *et al.* The requirement for DNAM-1, NKG2D, and NKp46 in the natural killer cell-mediated killing of myeloma cells. *Cancer Res.* **67,** 8444–8449 (2007).
262. Fauriat, C., Mallet, F., Olive, D. & Costello, R. T. Impaired activating receptor expression pattern in natural killer cells from patients with multiple myeloma. *Leukemia* **20,** 732–733 (2006).
263. Gati, A. *et al.* Analysis of the natural killer mediated immune response in metastatic renal cell carcinoma patients. *Int. J. Cancer* **109,** 393–401 (2004).
264. Tsukuda, M., Sawaki, S. & Yanoma, S. Suppressed cellular immunity in patients with nasopharyngeal carcinoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **120,** 115–118 (1993).
265. Pierson, B. A. & Miller, J. S. CD56+bright and CD56+dim natural killer cells in patients with chronic myelogenous leukemia progressively decrease in number, respond less to stimuli that recruit clonogenic natural killer cells, and exhibit decreased proliferation on a per cell basis. *Blood* **88,** 2279–2287 (1996).

266. Chang, W. C., Fujimiya, Y., Casteel, N. & Pattengale, P. Natural killer cell immunodeficiency in patients with chronic myelogenous leukemia. III. Defective interleukin-2 production by T-helper and natural killer cells. *Int. J. Cancer* **43,** 591–597 (1989).
267. Ballas, Z. K., Rasmussen, W. & van Otegham, J. K. Lymphokine-activated killer (LAK) cells. II. Delineation of distinct murine LAK-precursor subpopulations. *J. Immunol.* **138,** 1647–1652 (1987).
268. Zychlinsky, A., Joag, S., Liu, C. C. & Young, J. D. Cytotoxic mechanisms of murine lymphokine-activated killer cells: functional and biochemical characterization of homogeneous populations of spleen LAK cells. *Cell. Immunol.* **126,** 377–390 (1990).
269. Kayagaki, N. *et al.* Expression and function of TNF-related apoptosis-inducing ligand on murine activated NK cells. *J. Immunol.* **163,** 1906–1913 (1999).
270. Robinson, B. W. & Morstyn, G. Natural killer (NK)-resistant human lung cancer cells are lysed by recombinant interleukin-2-activated NK cells. *Cell. Immunol.* **106,** 215–222 (1987).
271. Lotzová, E., Savary, C. A. & Herberman, R. B. Induction of NK cell activity against fresh human leukemia in culture with interleukin 2. *J. Immunol.* **138,** 2718–2727 (1987).
272. Lotzová, E., Savary, C. A. & Herberman, R. B. Inhibition of clonogenic growth of fresh leukemia cells by unstimulated and IL-2 stimulated NK cells of normal donors. *Leukemia Research* **11,** 1059–1066 (1987).
273. Lafreniere, R. & Rosenberg, S. A. Successful immunotherapy of murine experimental hepatic metastases with lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin 2. *Cancer Res.* **45,** 3735–3741 (1985).
274. Rosenberg, S. A., Mulé, J. J., Spiess, P. J., Reichert, C. M. & Schwarz, S. L. Regression of established pulmonary metastases and subcutaneous tumor mediated by the systemic administration of high-dose recombinant interleukin 2. *J. Exp. Med.* **161,** 1169–1188 (1985).
275. Maekawa, R., Matsumoto, M., Kitagawa, T., Harada, M. & Sato, K. Effect of recombinant interleukin 2 (R-IL2) on in vivo growth of murine myeloma X5563. *Cancer Immunol. Immunother.* **23,** 25–30 (1986).
276. Thompson, J. A. *et al.* Eradication of disseminated murine leukemia by treatment with high-dose interleukin 2. *J. Immunol.* **137,** 3675–3680 (1986).
277. Vaage, J. Local and systemic effects during interleukin-2 therapy of mouse mammary tumors. *Cancer Res.* **47,** 4296–4298 (1987).
278. Rutten, V. P. *et al.* Local interleukin-2 therapy in bovine ocular squamous cell carcinoma. A pilot study. *Cancer Immunol. Immunother.* **30,** 165–169 (1989).
279. Maas, R. A., Van Weering, D. H., Dullens, H. F. & Otter, Den, W. Intratumoral low-dose interleukin-2 induces rejection of distant solid tumour. *Cancer Immunol. Immunother.* **33,** 389–394 (1991).
280. Otter, Den, W. *et al.* Effective immunotherapy with local low doses of interleukin-2. *In Vivo* **5,** 561–565 (1991).
281. Hinuma, S. *et al.* Suppression of pulmonary tumour metastasis in mice by recombinant human interleukin-2: role of asialo GM1-positive cells. *Immunology* **60,** 173–179 (1987).
282. Whiteside, T. L., Chikamatsu, K., Nagashima, S. & Okada, K. Antitumor effects of cytolytic T lymphocytes (CTL) and natural killer (NK) cells in head and neck cancer. *Anticancer Res.* **16,** 2357–2364 (1996).

283. Whiteside, T. L. *et al.* Human tumor antigen-specific T lymphocytes and interleukin-2-activated natural killer cells: comparisons of antitumor effects in vitro and in vivo. *Clin. Cancer Res.* **4,** 1135–1145 (1998).
284. Egilmez, N. K. *et al.* Cytokine immunotherapy of cancer with controlled release biodegradable microspheres in a human tumor xenograft/SCID mouse model. *Cancer Immunol. Immunother.* **46,** 21–24 (1998).
285. Alici, E. *et al.* Anti-myeloma activity of endogenous and adoptively transferred activated natural killer cells in experimental multiple myeloma model. *Exp. Hematol.* **35,** 1839–1846 (2007).
286. Rosenberg, S. A. *et al.* A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone. *N. Engl. J. Med.* **316,** 889–897 (1987).
287. Gratama, J. W. *et al.* Activation of the immune system of cancer patients by continuous i.v. recombinant IL-2 (rIL-2) therapy is dependent on dose and schedule of rIL-2. *Clin. Exp. Immunol.* **92,** 185–193 (1993).
288. Moltó, L. *et al.* Immunological changes in peripheral blood mononuclear cells of patients with metastatic renal cell carcinoma after low doses of subcutaneous immunotherapy with IFN-alpha-2b and IL-2. *J. Immunother.* **22,** 260–267 (1999).
289. Moroni, M. *et al.* Eosinophils and C4 predict clinical failure of combination immunotherapy with very low dose subcutaneous interleukin-2 and interferon in renal cell carcinoma patients. *Haematologica* **85,** 298–303 (2000).
290. Atzpodien, J. *et al.* Expansion of peripheral blood natural killer cells correlates with clinical outcome in cancer patients receiving recombinant subcutaneous interleukin-2 and interferon-alpha-2. *Tumour Biol.* **14,** 354–359 (1993).
291. Jørkov, A. S. *et al.* Immune response in blood and tumour tissue in patients with metastatic malignant melanoma treated with IL-2, IFN alpha and histamine dihydrochloride. *Anticancer Res.* **23,** 537–542 (2003).
292. Taieb, J. *et al.* A novel dendritic cell subset involved in tumor immunosurveillance. *Nat. Med.* **12,** 214–219 (2006).
293. Mignot, G. *et al.* The critical role of IL-15 in the antitumor effects mediated by the combination therapy imatinib and IL-2. *J. Immunol.* **180,** 6477–6483 (2008).
294. Vremec, D. *et al.* Production of interferons by dendritic cells, plasmacytoid cells, natural killer cells, and interferon-producing killer dendritic cells. *Blood* **109,** 1165–1173 (2007).
295. Caminschi, I. *et al.* Putative IKDCs are functionally and developmentally similar to natural killer cells, but not to dendritic cells. *J. Exp. Med.* **204,** 2579–2590 (2007).
296. Blasius, A. L., Barchet, W., Cella, M. & Colonna, M. Development and function of murine B220+CD11c+NK1.1+ cells identify them as a subset of NK cells. *J. Exp. Med.* **204,** 2561–2568 (2007).
297. Guimont-Desrochers, F. *et al.* Redefining interferon-producing killer dendritic cells as a novel intermediate in NK-cell differentiation. *Blood* **119,** 4349–4357 (2012).
298. Chan, C. W. *et al.* Interferon-producing killer dendritic cells provide a link between innate and adaptive immunity. *Nat. Med.* **12,** 207–213 (2006).
299. Vosshenrich, C. A. J. *et al.* CD11cloB220+ interferon-producing killer dendritic cells are activated natural killer cells. *J. Exp. Med.* **204,** 2569–2578 (2007).
300. Desbois, M., Rusakiewicz, S., Locher, C., Zitvogel, L. & Chaput, N. Natural killer cells in non-hematopoietic malignancies. *Front. Immun.* **3,** (2012).
301. Lissoni, P. Effects of low-dose recombinant interleukin-2 in human malignancies. *Cancer J Sci Am* **3 Suppl 1,** S115–20 (1997).

302. Farace, F. *et al.* Low-dose IL-2 treatment: activation of discrete T- and NK-cell sub-populations in vivo. *Int. J. Cancer* **62,** 523–528 (1995).
303. Ghiringhelli, F., Ménard, C., Martin, F. & Zitvogel, L. The role of regulatory T cells in the control of natural killer cells: relevance during tumor progression. *Immunol. Rev.* **214,** 229–238 (2006).
304. Pollack, I. F. *et al.* Phase I trial of imatinib in children with newly diagnosed brainstem and recurrent malignant gliomas: a Pediatric Brain Tumor Consortium report. *Neuro-Oncology* **9,** 145–160 (2007).
305. Gustavson, L. E., Nadeau, R. W. & Oldfield, N. F. Pharmacokinetics of teceleukin (recombinant human interleukin-2) after intravenous or subcutaneous administration to patients with cancer. *J Biol Response Mod* **8,** 440–449 (1989).
306. Kirchner, G. I. *et al.* Pharmacokinetics of recombinant human interleukin-2 in advanced renal cell carcinoma patients following subcutaneous application. *Br J Clin Pharmacol* **46,** 5–10 (1998).
307. Peng, B. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Imatinib in a Phase I Trial With Chronic Myeloid Leukemia Patients. *Journal of Clinical Oncology* **22,** 935–942 (2004).
308. Elkahwaji, J. *et al.* Decrease in hepatic cytochrome P450 after interleukin-2 immunotherapy. *Biochem. Pharmacol.* **57,** 951–954 (1999).
309. Hosten, B. *et al.* Effect of interleukin-2 pretreatment on paclitaxel absorption and tissue disposition after oral and intravenous administration in mice. *Drug Metab. Dispos.* **36,** 1729–1735 (2008).
310. Hosten, B. *et al.* Interleukin-2 treatment effect on imatinib pharmacokinetic, P-gp and BCRP expression in mice. *Anticancer Drugs* **21,** 193–201 (2010).
311. Eechoute, K. *et al.* Drug transporters and imatinib treatment: implications for clinical practice. *Clin. Cancer Res.* **17,** 406–415 (2011).
312. Eechoute, K. *et al.* A Long-term Prospective Population Pharmacokinetic Study on Imatinib Plasma Concentrations in GIST Patients. *Clin. Cancer Res.* (2012). doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-0490
313. Burger, H. *et al.* Chronic imatinib mesylate exposure leads to reduced intracellular drug accumulation by induction of the ABCG2 (BCRP) and ABCB1 (MDR1) drug transport pumps. *Cancer Biol. Ther.* **4,** 747–752 (2005).
314. Saadoun, D. *et al.* Regulatory T-cell responses to low-dose interleukin-2 in HCV-induced vasculitis. *N. Engl. J. Med.* **365,** 2067–2077 (2011).
315. Koreth, J. *et al.* Interleukin-2 and regulatory T cells in graft-versus-host disease. *N. Engl. J. Med.* **365,** 2055–2066 (2011).
316. Ettinghausen, S. E. *et al.* Hematologic effects of immunotherapy with lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 in cancer patients. *Blood* **69,** 1654–1660 (1987).
317. Oleksowicz, L. *et al.* Alterations of platelet function induced by interleukin-2. *J. Immunother.* **10,** 363–370 (1991).
318. Lenardo, M. J. Interleukin-2 programs mouse alpha beta T lymphocytes for apoptosis. *Nature* **353,** 858–861 (1991).
319. Zheng, L., Trageser, C. L., Willerford, D. M. & Lenardo, M. J. T cell growth cytokines cause the superinduction of molecules mediating antigen-induced T lymphocyte death. *J. Immunol.* **160,** 763–769 (1998).
320. Marchetti, G. *et al.* Interleukin-2 immunotherapy exerts a differential effect on CD4 and CD8 T cell dynamics. *AIDS* **18,** 211–216 (2004).

321. Caligiuri, M. A. *et al.* Selective modulation of human natural killer cells in vivo after prolonged infusion of low dose recombinant interleukin 2. *J. Clin. Invest.* **91,** 123–132 (1993).
322. Bernstein, Z. P. *et al.* Prolonged administration of low-dose interleukin-2 in human immunodeficiency virus-associated malignancy results in selective expansion of innate immune effectors without significant clinical toxicity. *Blood* **86,** 3287–3294 (1995).
323. Evans, J. H. *et al.* A distinct subset of human NK cells expressing HLA-DR expand in response to IL-2 and can aid immune responses to BCG. *Eur. J. Immunol.* **41,** 1924–1933 (2011).
324. Welner, R. S. *et al.* Interferon-producing killer dendritic cells (IKDCs) arise via a unique differentiation pathway from primitive c-kitHiCD62L+ lymphoid progenitors. *Blood* **109,** 4825–4931 (2007).
325. Polite, B. N., Desai, A. A., Manchen, B. & Stadler, W. M. Combination therapy of imatinib mesylate and interferon-alpha demonstrates minimal activity and significant toxicity in metastatic renal cell carcinoma: results of a single- institution phase II trial. *Clin Genitourin Cancer* **4,** 275–280 (2006).
326. Heinrich, M. C. *et al.* Correlation of kinase genotype and clinical outcome in the North American Intergroup Phase III Trial of imatinib mesylate for treatment of advanced gastrointestinal stromal tumor: CALGB 150105 Study by Cancer and Leukemia Group B and Southwest Oncology Group. *Journal of Clinical Oncology* **26,** 5360–5367 (2008).
327. Sconocchia, G. *et al.* Melanoma cells inhibit NK cell functions. *Cancer Res.* **72,** 5428–9– author reply 5430 (2012).
328. Platonova, S. *et al.* Profound coordinated alterations of intratumoral NK cell phenotype and function in lung carcinoma. *Cancer Res.* **71,** 5412–5422 (2011).
329. Garcia-Iglesias, T. *et al.* Low NKp30, NKp46 and NKG2D expression and reduced cytotoxic activity on NK cells in cervical cancer and precursor lesions. *BMC Cancer* **9,** 186 (2009).
330. Dewan, M. Z. *et al.* Natural killer cells in breast cancer cell growth and metastasis in SCID mice. *Biomed. Pharmacother.* **59 Suppl 2,** S375–9 (2005).
331. Dewan, M. Z. *et al.* Role of natural killer cells in hormone-independent rapid tumor formation and spontaneous metastasis of breast cancer cells in vivo. *Breast Cancer Res Treat* **104,** 267–275 (2007).
332. Mamessier, E. *et al.* Human breast tumor cells induce self-tolerance mechanisms to avoid NKG2D-mediated and DNAM-mediated NK cell recognition. *Cancer Res.* **71,** 6621–6632 (2011).
333. Sconocchia, G. *et al.* Tumor infiltration by FcγRIII (CD16)+ myeloid cells is associated with improved survival in patients with colorectal carcinoma. *Int. J. Cancer* **128,** 2663–2672 (2011).
334. Carlsten, M. *et al.* Primary human tumor cells expressing CD155 impair tumor targeting by down-regulating DNAM-1 on NK cells. *J. Immunol.* **183,** 4921–4930 (2009).
335. Da Riva, L. *et al.* Proteomic detection of a large amount of SCGFα in the stroma of GISTs after imatinib therapy. *J Transl Med* **9,** 158 (2011).
336. Hiraoka, A. *et al.* Stem cell growth factor: in situ hybridization analysis on the gene expression, molecular characterization and in vitro proliferative activity of a recombinant preparation on primitive hematopoietic progenitor cells. *Hematol. J.* **2,** 307–315 (2001).

337. Ghiringhelli, F. *et al.* CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. *J. Exp. Med.* **202,** 1075–1085 (2005).
338. Joensuu, H. *et al.* Risk of recurrence of gastrointestinal stromal tumour after surgery: an analysis of pooled population-based cohorts. *The Lancet Oncology* **13,** 265–274 (2012).
339. Picard, S. *et al.* Trough imatinib plasma levels are associated with both cytogenetic and molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia. *Blood* **109,** 3496–3499 (2007).
340. Larson, R. A. *et al.* Imatinib pharmacokinetics and its correlation with response and safety in chronic-phase chronic myeloid leukemia: a subanalysis of the IRIS study. *Blood* **111,** 4022–4028 (2008).
341. Singh, N., Kumar, L., Meena, R. & Velpandian, T. Drug monitoring of imatinib levels in patients undergoing therapy for chronic myeloid leukaemia: comparing plasma levels of responders and non-responders. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **65,** 545–549 (2009).
342. Demetri, G. D. *et al.* Imatinib plasma levels are correlated with clinical benefit in patients with unresectable/metastatic gastrointestinal stromal tumors. *Journal of Clinical Oncology* **27,** 3141–3147 (2009).

ANNEXES

Annexe 1 : Locher C. *et al,*. 2010

Annexe 2 : Ma Y. *et al,*. 2011

Annexe 3 : Desbois M. *et al.* 2012

Ann. N.Y. Acad. Sci. ISSN 0077-8923

ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES
Issue: *Clearance of Dying Cells in Healthy and Diseased Immune Systems*

Desirable cell death during anticancer chemotherapy

Clara Locher,[1,2,3,4] Rosa Conforti,[1,2] Laetitia Aymeric,[1,2,3] Yuting Ma,[1,2,3] Takahiro Yamazaki,[1,2] Sylvie Rusakiewicz,[1,2,3] Antoine Tesnière,[2,5] François Ghiringhelli,[6,7] Lionel Apetoh,[1,2,3] Yannis Morel,[8] Jean-Philippe Girard,[9,10] Guido Kroemer,[5,11,12,13,14] and Laurence Zitvogel[1,2,3,4]

[1]Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1015, Villejuif, France. [2]Institut Gustave Roussy, Villejuif, France. [3]Université Paris-Sud, Villejuif, France. [4]CIC BT507 INSERM, Villejuif, France. [5]Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U848, Villejuif, France. [6]AVENIR Team, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Dijon, France. [7]Centre Georges François Leclerc, Dijon, France. [8]Innate Pharma, Marseille, France. [9]CNRS; IPBS (Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale), Toulouse, France. [10]Université de Toulouse, UPS, IPBS, Toulouse, France. [11]Metabolomics Platform, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France. [12]Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France. [13]Pôle de Biologie, Hôpital Européen Georges Pompidou, AP-HP, Paris, France. [14]Université Paris Descartes, Paris, France

Address for correspondence: Laurence Zitvogel, U1015 and CIC BT507, INSERM, Institut Gustave Roussy, 114 rue Edouard Vaillant, F-94805 Villejuif, France. zitvogel@igr.fr

The concept of immunogenic chemotherapy that has recently emerged relies upon the capacity of a cytotoxic compound to trigger a cell-death modality. This modality elicits cross-priming by dendritic cells of tumor antigen-specific T cells that will contribute to the tumoricidal activity of the compound and protect the host against relapse. In contrast, most anticancer drugs elicit nonimmunogenic apoptosis that is not accompanied with an immunizing property. This review will discuss some molecular and metabolic changes required at the level of the tumor that must engage key pathways at the level of the host for the induction of Tc1 polarized–protective T cell responses during chemotherapy. We will summarize the immune adjuvants that can boost the immunogenicity of cell death to augment the efficacy of chemotherapy.

Keywords: cancer; immunogenic cell death; immunotherapy; chemotherapy; toll-like receptor

Introduction

Current cancer therapeutic modalities include surgery, radiotherapy, hormonotherapy, chemotherapy, and the targeting of specific compounds. These strategies can lead to complete remission, yet the vast majority of cases experience stable disease that eventually relapses and develops into distant metastases. The question remains as to predicting which patients and/or malignancies will likely benefit from these often toxic medications.

Theoretically, immunotherapy is aimed at generating long-term specific antitumor immune responses that may be able to ensure clearance of residual tumor cells while sparing the healthy tissues. The potential power of the latter strategy have been brought up with the adoptive transfer of tumor infiltrating lymphocytes in melanoma,[1] with overlapping major histocompatiblity complex (MHC) class I and II peptides in vulvar human papilloma virus 16-induced *in situ* malignancies,[2] with anti-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA4) antibodies in melanoma,[3] and with autologous dendritic cells (DC) in hormonoresistant prostate cancer.[4]

For decades, the combinatorial regimen associating cytotoxic anticancer compounds together with immune based-strategies were disregarded in as much as the dose intensity concept leading to mild myelosuppression (and profound lymphopenia) and the use of steroids would jeopardize, on theoretical grounds, the elicitation of a long-term antitumor immune response.[5]

Over the past few years, the concept of tumor immunosurveillance has been rekindled with the seminal demonstration that residual disease is controlled by T cells and interferon (IFN)-γ/interleukin (IL)-12 cytokines.[6] Moreover, conventional anticancer therapies administered against growing tumors and established tolerance may reset the immune system by not only debulking it but also by a cell-death modality capable of mounting an

doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05763.x

efficient anticancer immune response contributing to tumor eradication.[7,8] Indeed, a minority of cytotoxic compounds can promote such an immunogenic cell death that is desirable for the cure of the tumor bearing host. For example, ionizing radiation, anthracyclines, and oxaliplatin elicit an endoplasmic reticulum (ER) stress response on the side of the tumor, leading to mobilization of host DC that will engulf apoptotic bodies.[9] DC are mandatory for antigen-specific type 1 helper (Th1) and cytotoxic (Tc1) T-cell priming in the draining lymph nodes of dying established tumors in treated animals by days 5–7 post-therapy.[10] Consequently, $CD8^+$ T lymphocytes and IFNγ/IFNγR pathways are mandatory for the optimal response of the host to chemotherapy in a variety of transplantable tumor models.[11]

The comprehensive understanding of the cellular cues and molecular pathways involved in the immunogenicity of cell death will delineate the combinatorial code of cell death associated molecular patterns (CDAMPs) involved in the transition between homeostatic inflammation and immunity. It is conceivable that a spatiotemporal sequence and threshold events coordinate find me/keep out signals, eat-me/don't eat-me signals, exposure of hidden molecules that will dictate the recruitment of inflammatory phagocytes, their activation status, and the pro- or anti-inflammatory milieu associated with cell death. Therefore, dissecting the type of cell-death modality at the biological, biochemical, and metabolic levels will unravel the key CDAMPs that are mandatory for the success of chemotherapy.[12]

Some of the molecular pathways elicited by these immunogenic anticancer treatments and required for the immunogenic tumor cell death have been characterized. Especially, immunogenic chemotherapy or radiotherapy leads to the exposure of calreticulin (CRT)[9] and the release of high-mobility group box 1 (HMGB1) from dying tumor cells[10]; CRT and HMGB1 play the roles of an "eat me" and a "danger" signal, respectively, thereby facilitating engulfment and processing of apoptotic bodies by DC. Recently, we also elucidated that dying tumor cells must release adenosine triphosphate (ATP) to engage P2RX7 on host DC, stimulating the release of interleukin-1 β (IL-1β), which in turn elicits tumor-specific IFN-γ producing $CD8^+$ T cells that are indispensable for the success of chemotherapy.[11,13] The latter pathway will be discussed in more detail in this review.

Considering the key role of the host immune system in the efficacy of immunogenic anticancer treatments, we will discuss strategies that boost the immune system and therefore improve clearance of tumor cells while unexpectedly, others failed to do so. We will focus on toll-like receptor 3 (TLR3) agonists that not only play a role as immune adjuvants but also mitigate the tumor parenchyma to enhance *in situ* trafficking of antitumor effector cells. These cells mediate potent adjuvant effects on the immune system; they strongly enhance antigen-specific $CD8^+$ T cell responses, promote antigen cross-presentation by DC, and directly act on effector $CD8^+$ T and natural killer (NK) cells to augment IFN-γ release.[14]

Chemotherapy may enhance immunogenic clearance of tumor cells

Apoptosis is often described as a cell-death modality occurring in an immunologically silent process. Indeed, apoptotic cells are removed by phagocytosis without provoking an immune response.[15] However, under certain circumstances where CDAMPs can be exposed,[12] some conventional anticancer therapies do induce a modality of cellular demise accompanied with innate and cognate immune responses, which in turn contribute to tumor clearance.[8] Notably, anthracyclines, oxaliplatin, and ionizing irradiation activate a type of tumor cell death that elicits efficient anticancer immune responses depending on DC, T cells, and the IFNγ/IFNγR signaling pathway but not the lytic (machinery tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand [TRAIL] and perforin).[11]

We delineated the molecular mechanisms underlying the recognition of dying tumor cells by DC and found three major checkpoints that dictate the immunogenicity of cell death. First, ER—resident protein complex (composed of CRT and the disulfide isomerase ERp57) must be exposed to the plasma membrane of tumor cells.[9] Second, the chromatin-binding HMGB1 protein must be released by dying tumor cells and should bind to its receptor TLR4 on DC.[10] Third, we recently elucidated that dying tumor cells must release ATP to engage P2RX7—a purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 7—on host DC, stimulating the release of IL-1β, which in turn promote tumor antigen-specific $CD8^+$ T cells.[11]

The key roles of CRT/ERp57 and HMGB1 in the induction of immunogenic tumor cell death

have been detailed in previous reviews.[16,17] Therefore, we will essentially focus on the ATP/P2RX7 signaling cascade culminating in the activation of the nucleotide-binding and oligomerization domain (NOD)-like receptor family, pyrine domain containing (NLRP3) inflammasome.[18]

Calreticulin/ERp57 redistribution

Calreticulin and ERp57 predominantly reside within the lumen of the ER where they act as a Ca^{+2} binding lectin chaperone and a disulfide oxidation catalyzer, respectively.[19,20] In response to immunogenic chemotherapy or radiotherapy, CRT/ERp57 exposure occurs at a pre-apoptotic stage—before the cells exhibit cell surface phosphatidylserine residues—and results from an ER stress response.[9] Phosphorylation of the eukaryotic translation initiation factor eIF2α by the kinase PERK or by inhibition of the PP1/GADD34 phosphatase complex is followed by caspase-8-mediated proteolysis of the ER-sessile protein BAP31, which in turn triggers the activation of the pro-apoptotic proteins Bax and Bak. Then, the anterograde transport of CRT/ERp57 from the ER to the Golgi apparatus results in the translocation of CRT/ERp57 complexes onto the plasma membrane.[21] Once exposed on the membrane, the CRT/ERp57 complex plays the role of an "eat-me" signal promoting uptake by DC of dying tumor cells.[9,22,23] The receptor of phagocytosis recognizing dying cells in a CRT-ERp57-dependent manner remains to be determined.

HMGB1/TLR4

HMGB1 is a non-histone chromatin-binding protein that acts as a transcription factor when present in the nucleus, as well as a pro-inflammatory cytokine, when released from inflammatory or dying cells.[24] HMGB1 was primarily shown to be released from damaged and necrotic cells, but it has been recently reported that late apoptosis is also associated with HMGB1 release.[25] Indeed, immunogenic anticancer treatment induces HMGB1 release into the extracellular milieu by dying tumor cells following various hits (X rays, anthracyclines, oxaliplatin). Once HMGB1 resides in the extracellular milieu, it behaves as an alarmin and binds to its receptor, TLR4, which is expressed on DC. Then, signaling through TLR4 and its adaptor MyD88 controls the initiation phase of cognate immune responses by regulating the processing of the phagocytic cargo and the cross-presentation of tumor antigens by DC on MHC class I molecules.[10] This effect could be attributed to the TLR4-dependent inhibition of the lysosome-dependent degradation of the phagocytic cargo, resulting in improved tumor antigen cross-presentation.[26]

Adenosine triphosphate/P2RX7 and NLRP3/IL-1β

Additional signals emanating from dying tumor cells are required for the induction of an antitumor immune response. One of the lead members of the NLR family, the pyrin domain-containing 3 (NLRP3) inflammasome—also known as NALP3 and cryopyrin—has been investigated in several settings of injury.[27] NLRP3 inflammasome is a multimeric protein complex that is composed of NLRP3, the adaptor molecule ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain [CARD]), cardinal (CARD8), and the effector molecule caspase-1.[28] Activation of the NLRP3 inflammasome platform results in the activation of caspase-1 and the resultant processing of pro-IL-1β into biologically active IL-1β.[29]

Previous reports demonstrated that IL-1β release by macrophages requires two stimuli: one inflammatory signal through TLR activation to induce the expression of pro-IL-1β at the transcriptional level and a second stimulus, such as ATP or monosodium urate crystals, to ignite the inflammasome which activates the autocatalytic processing of procaspase-1 into active caspase-1, which culminates in the cleavage of pro-IL-1β into active and secreted IL-1β.[30,31] Furthermore, ATP does not directly activate NLRP3 but induces the caspase-1-dependent maturation of IL-1β by activating P2RX7 receptors, which results in the rapid efflux of intracellular K^+.[32]

Therefore, to investigate the role of the NLRP3 inflammasome in the antitumor immune response elicited by chemotherapy, tumor growth kinetics of EL4 thymoma cells treated with oxaliplatin were compared in wild-type (WT) mice versus mice deficient in P2RX7, NLRP3, or Casp1.[11] In these deficient mice, anticancer chemotherapy turned out to be inefficient against established tumors, indicating that each individual player is critical for the immunogenicity of cell death triggered by anthracyclines, oxaliplatin, or X-rays.

Then, to investigate the contribution of the inflammasome/IL-1β axis in the production of IFNγ in response to anthracyclines or oxaliplatin,

we inoculated dying tumor cells exposed to chemotherapy *ex vivo* into WT mice versus P2RX7 or casp-1 or IL-1R1 deficient animals and compared the differential capacity of T lymphocytes to respond to tumor antigens by producing IFNγ. Following immunization with dying cells, T cells derived from mice deficient in each individual component of the inflammasome/IL-1β axis (NLRP3, Casp-1, IL-1R1) failed to mount optimal IFNγ polarized $CD8^+$ T-cell responses.[11] This surrogate marker of immunization, correlated with the lack of capacity of such hosts to reject a rechallenge with live tumor cells while WT counterparts, were protected.

Importantly, we extended the finding that the IL-1b/IL-1R1 signaling pathway was pivotal for the success of chemotherapy by showing that (i) blocking this pathway in established CT26 ($H\text{-}2^{d+}$ colon cancer) or MC38 ($H\text{-}2^{b+}$ colorectal adenocarcinoma), or MCA 205 ($H\text{-}2^{b+}$ sarcoma) sarcomas antagonized the efficacy of oxaliplatin or doxorubicin or mitoxanthrone and (ii) the susceptibility of MCA-induced spontaneous sarcomas to prophylactic treatment with doxorubicin was compromised in IL-1R1 knockout (KO) mice or WT animals treated with neutralizing anti-IL-1b Ab or IL-1RA molecules.[11] Hence, extracellular ATP released from dying cells engages P2RX7 receptors on DC, thereby triggering the NLRP3/ASC/caspase-1 inflammasome that culminates in IL-1β production (Fig. 1). Indeed, we showed that IL-1β is a co-stimulatory cytokine required during T-cell receptor (TCR) engagement for the adequate polarization of IFNγ-producing $CD8^+$ T cells in the context of processing of cell associated antigens but not whole proteins.[11]

Clinical relevance

We speculate that defects on the immunogenic cell-death pathway may compromise the efficacy of anticancer therapies. Therefore, we investigated the prognostic value of two single-nucleotide polymorphisms.

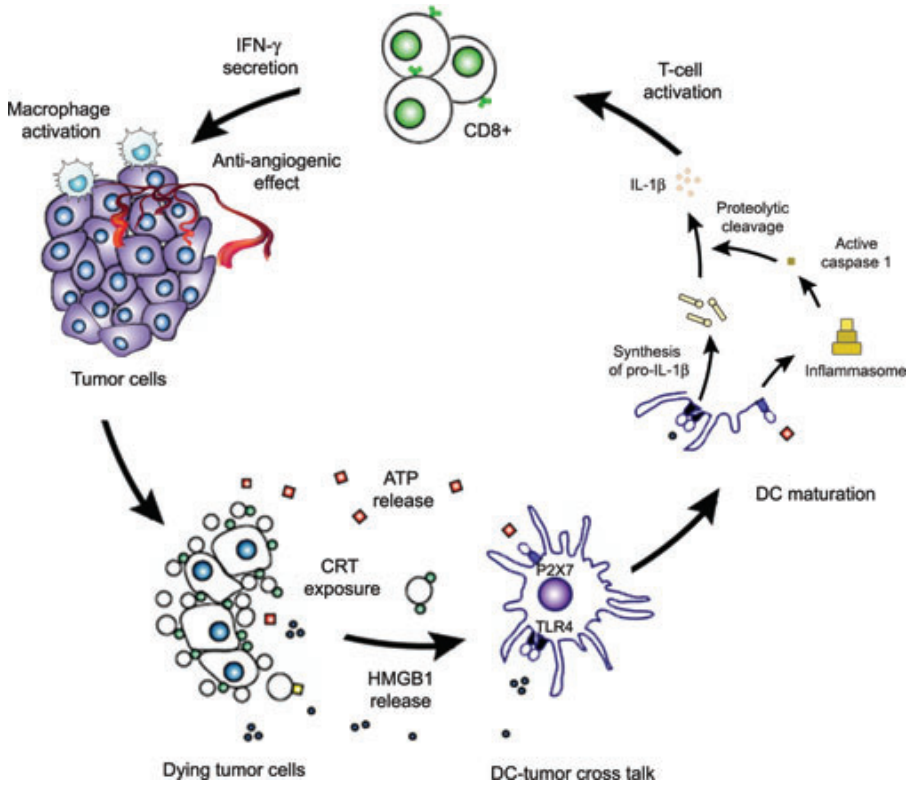


Figure 1. Scheme of the CDAMPs secreted by dying tumor cells and associated with immunogenic chemotherapy. Following tumor insult by cytotoxic agents, tumor cells rapidly translocate intracellular CRT to the cell surface, which acts as a mandatory eat-me signal for DC. ATP and HMGB1 released by dying tumor cells act in concert to ignite the NLRP3 inflammasome in DC, culminating in IL-1β processing and secretion in the extracellular milieu. IL-1β then contributes to the TCR-driven IFNγ polarized $CD8^+$ T-cell response, a mandatory step for the efficacy of chemotherapy. IFNγ mediates potent antitumor effects via macrophage activation and/or anti-angiogenic effects.

One polymorphism, localized in human TLR4 (rs4986790), was found to reduce the binding of HMGB1 to human TLR4, thus inhibiting HMGB1-dependent DC to T-cell cross-talk.[10] We next investigated the prognostic value of a single nucleotide polymorphism in the ligand-gated cation channel P2RX7 at nucleotide position 1513 (1513A>C) by changing a glutamic acid to alanine at amino acid 496 (Glu496Ala), which affects the ATP-dependent IL-1β release from monocytes.[33] We analyzed 225 sporadic breast cancer patients, all with the normal TLR4 allele, that were stratified according to their *P2×7* genotype (normal [64%] versus variant [36%] *P2×7*). While there were no significant differences in classical prognostic factors between normal and variant group of patients, the *P2×7* loss-of-function-allele had a significant negative prognostic impact on metastatic disease-free survival (Log rank test; $P = 0.02$). A multivariate Cox regression model confirmed a significant effect for tumor grade and for *P2×7* genotype.[11]

Boosting the immune system to increase tumor clearance

While most "immunogenic" cytotoxic compounds trigger a protective immune response that contributes to the tumoricidal activity of the drug, they fail to control the disease in most cases, specifically when transplantable tumors reached a certain size. Therefore, several adjuvants or complementary strategies could synergize with immunogenic chemotherapies on theorical grounds, either to augment T cell priming or to boost T cell recruitment into tumor beds. Boosting DC functions through TLR or NLR agonists or rGM-CSF represent interesting options. T cell functions could also be strengthen with anti-PD1, anti-CTLA4 Ab or with 4-1BB. Finally, innate effectors such as iNKT and NK cells could be stimulated by CD1d agonists or rIL-15 or antibody-dependent cell cytotoxicity. Likewise, harnessing the tumor parenchyma for the chemoattraction of Tc1 antitumor T cells to tumor beds may be an alternative option (as detailed below). In elegant studies, some investigators have shown that interfering with don't eat me signals (such as blocking CD47 expressed by tumor cells),[34,35] or blocking the clearance of apoptotic bodies by macrophages (using annexin V)[36] may result in enhanced protection of the host against tumor outgrowth or dissemination.

Strategies harnessing iNKT that failed to synergize with immunogenic chemotherapy

Stimulating the IL-33/ST2 pathway

IL-33 (IL-1F11, DVS27, NF-HEV) is the 11th member in the IL-1 family of cytokines (which includes IL-1α, IL-1β, IL-18) originally characterized as a nuclear factor from high endothelial venules.[37,38]

Although IL-33 was first described as a pro-Th2 cytokine inducing the production of IL-4, IL-5, and/or IL-13 from Th2; eosinophils; mast cells; and basophils,[39] IL-33 could also markedly enhance Th1 cytokine (IFNγ) production by iNKT in the presence of IL-12 or boost both Th1/Th2 cytokine release by iNKT triggered through their TCR.[40] In as much as iNKT are not "naturally" involved in the immunogenicity of chemotherapy (Ma, Y. *et al.*, manuscript in revision), we hypothesized that mobilizing iNKT cells through IL-33/ST2 signaling could be advantageous in combination with conventional T cell activation.

First, we investigated whether ST2 was a mandatory receptor for the success of chemotherapy by comparing the tumoricidal activity of mitoxanthrone against established MCA205 in WT versus ST2 KO mice. We concluded that ST2 was dispensable for the efficacy of chemotherapy (data not shown), which prompted us to use high dosing of recombinant IL-33 in an attempt to synergize with other cytokines of the inflammasome platform (such as rIL-1b, which is indispensable for the success of cell-death inducers). rIL-33 could indeed activate iNKT cells in spleens of treated mice[41] (data not shown). However, at any dosing, rIL-33 did not add any benefit to the anti-tumor effects mediated by chemotherapy (C57BL/6 mice bearing established MCA205 tumors) or radiotherapy (Balb/c mice bearing established TSA tumors) (Fig. 2A). This could be accounted for by the high expression levels of IL-33 recovered pre-and post-chemotherapy or radiotherapy in tumor beds regardless of the efficacy of the therapy (Fig. 2B).

Use of αGal-Cer

The antitumor properties of iNKT cells in mice have been reviewed elsewhere.[42] Our ability to actively and reliably manipulate iNKT in mice and humans has broad therapeutic potential in cancer. Alpha-galactosylceramide (αGal-Cer) is a synthetic glycolipid derived from a marine sponge

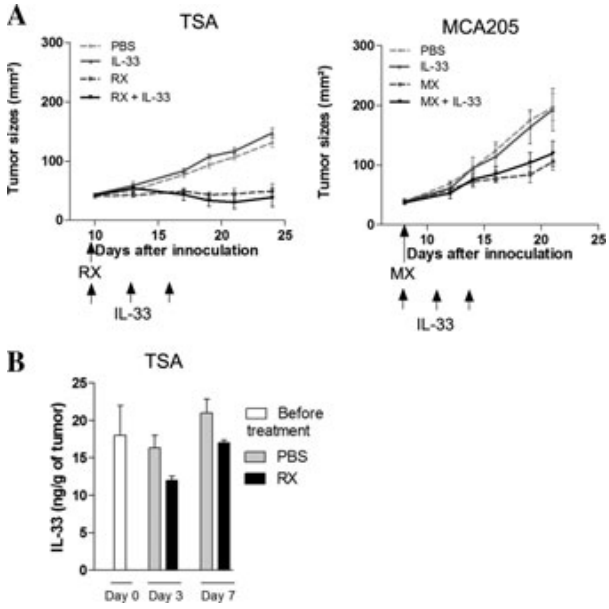


Figure 2. **Impact of IL-33/ST2 in the efficacy of chemo- and radiotherapy. (A) Balb/c or C57BL/6 mice bearing established TSA or MCA205 tumors were treated with local irradiation (RX) or mitoxantrone (MX), respectively, and/or injected i.p. every 3 days with rIL-33 (4 μg/mouse). Tumor sizes were calculated using a caliper as means of diameters ± SEM of 5 mice/group, two experiments reaching similar results. (B) Tumor burdens were carefully removed, dissociated, and monitored after protein extraction by ELISA for the presence of IL-33 before, 3 days, and 7 days after local irradiation. ELISA results are shown as means of values for 5 tumors/group.**

that has been widely used in mouse tumor models[43,44] and human malignancies alone or together with DC[45,46,47] to harness NKT cells against cancer owing to its capacity to amplify NKT cells and generate a cytokine storm. Alternate ligands harnessing gycolipid-reactive CD1d restricted T cells are being developed for clinical use.

We used αGal-Cer together with doxorubicin, oxaliplatin or X Rays in a mouse colon cancer, a thymoma or a breast cancer model respectively along with αGal-Cer administered either shortly (the next day) or every other 3 days for a week. As shown in Figure 3, αGalCer (delivered either subcutaneously or intravenously) failed to boost tumoricidal activity of immunogenic chemotherapy or radiotherapy.

Immunochemotherapy combining tumor vaccines and TLR3L is efficient

TLR recognize pathogen associated molecular patterns and are critical in linking innate and adaptive immune responses. TLR agonists are being clinically evaluated for their adjuvant effects on the immune system against various types of cancer, including leukemias, prostate and ovarian cancers, and gastrointestinal malignancies.[48] Since TLR4 was "naturally" involved in the immunogenicity of cell death while TLR3 and TLR9 were not,[10] we first investigated the capacity of TLR3 and TLR9 agonists to boost the TLR4-dependent antitumor effects of X-rays against TS/A mammary cancer.[49] We failed to observe that polyinosinic : polycytidylic acid (a TLR3L, poly[I:C]) or CpG oligodeoxynucleotide (a TLR9L) synergized with local irradiation in WT animals while both adjuvants could compensate for the lack of efficacy of the therapy in TLR4-deficient hosts.[49] Moreover, the polyadenylic : polyuridylic acid (poly[A:U]) could not synergize with oxaliplatinum against established B16 melanoma cell line expressing ovalbumin protein (B16-OVA) or GL26 glioblastoma.[50] We hypothetized that T cell priming triggered through oxaliplatinum alone in the draining lymph nodes of B16OVA treated tumors was insufficient to control tumor progression even in the presence of a potent TLR3 adjuvant. To go beyond the threshold of T cell priming reaching a clinical efficacy, we combined oxaliplatinum with poly(A:U) to a potent cancer vaccine.

Combining oxaliplatinum + TLR3L with cancer vaccines

Using a murine melanoma model genetically modified to overexpress OVA candidate tumor antigen (B16-OVA), we demonstrated the synergistic antitumor effects between a prime vaccination with the holoprotein OVA admixed with CpG ODN and subsequent oxaliplatinum-based chemotherapy followed by repeated intraperitoneal injections of poly(A:U). Indeed, administration of the vaccine before the combination of oxaliplatin and poly(A:U) significantly retarded tumor growth and prolonged the survival of B16OVA tumor-bearing mice, leading to 12% complete regressions.[50] In contrast, each component alone or combined with a second one failed to control the disease. We could demonstrate that the OVA-CpG ODN vaccine triggered SIINFEKL and OVA-specific Tc1 and $CD4^+$ T cell responses in the draining lymph nodes, respectively. Moreover, SIINFEKL-specific $CD8^+$ T cells expressed high levels of chemokine (C-X-C motif) receptor (CXCR) 3 and accumulated in tumor beds after completion of the tri-therapy.[50]

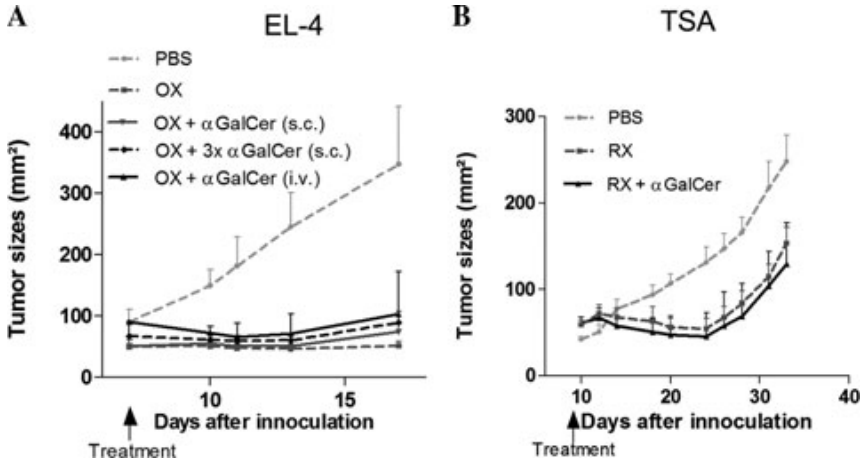


Figure 3. **Combinatorial effects of αGal-Cer and chemo- or radiotherapy. (A) EL-4 tumors were established in wild-type mice. When the tumors reached 80 mm² in size, mice were either left untreated or treated with i.p. oxaliplatine (OX) and with αGal-Cer (100 ng either subcutaneously or intravenously, either the next day after oxaliplatine or every other 3 days for a week). (B) Balb/c mice bearing established TSA tumors were treated with local irradiation (RX) and injected subcutaneously with αGal-Cer. Tumor sizes were calculated using a caliper as means of diameters ± SEM of 5 mice/group, two experiments reaching similar results (A, B). $^{*}P < 0.05$.**

In a second independent tumor model (GL26), the vaccine was composed of syngeneic dying tumor cells (their apoptosis being induced with doxorubicin combined with IFN type 1). Here again, prime inoculation of the tumor vaccine followed by oxaliplatinum + poly(A:U) markedly inhibited tumor progression[50] and each of three therapeutic components was mandatory for the prolonged survival of the tumor bearing mice.

In search for the mechanism of synergistic effects of immunochemotherapy

TLR3L were shown to mediate potent adjuvant effects through direct activation of NK cells, enhancement of antigen-specific $CD8^+$ T cell responses, and promotion of antigen cross-priming by DC. Poly(A:U) has been used in past clinical trials with the aim of inducing an IFN-mediated anticancer immune response.[51,52] However, TLR3 is not only expressed by immune cells but also by various types of epithelial or hematopoietic tumor cells, including leukaemias,[53] prostate cancer,[54] melanoma,[55] ovarian cancer, gastrointestinal malignancies, and breast cancers.[56] Interestingly, TLR3 signaling in melanoma and breast cancer cells can directly inhibit the proliferation of carcinoma cells or even induce apoptosis when combined with protein synthesis inhibitors or type I IFN.[56]

Consequently, we undertook the dissection of the direct (on tumor cells) versus the indirect (on immune cells) effects of poly(A:U) during its efficacy combined with oxaliplatinum and tumor vaccines.

Taking advantage of our two models—B16OVA and GL26—that both express TLR3 *in vitro* and *in vivo*, we investigated the direct and/or the indirect anti-tumor effects of poly(A:U). Interestingly, the tri-therapy failed to control tumor growth in both, Trif (the adaptor of TLR3 signaling)-deficient mice and in WT mice inoculated with tumor cells engineered to express a short hairpin RNA (shRNA) specific for tumoral Trif.[50] These findings suggest that poly(A:U) might exert direct effects both on the host's immune system and on the tumor parenchyma. Indeed, we confirmed that poly(A:U) triggered the concomitant release both *in vitro* and *in vivo* of a variety of chemokines, including chemokine (C-C motif) ligand (CCL)5 (RANTES) and chemokine (C-X-C motif) ligand (CXCL)10 (IP10), from TLR3-expressing tumors in a Trif-dependent manner.[50]

To investigate the impact of these two chemokines on the synergistic effects of the immunochemotherapy, both CCL5/CCR5 and CXCL10/CXCR3 signaling pathways were independently inhibited. Surprisingly, blockade of the CCL5/CCR5 pathway—using CCR5 deficient mice, MetRantes (a pharmacologic inhibitor of CCL5), or a shRNA that knocks down CCL5 at the level of tumor cells—improved the efficacy of the tri-therapy.[50] In contrast, blockade of the CXCL10/CXCR3 pathway—using CXCR3 deficient

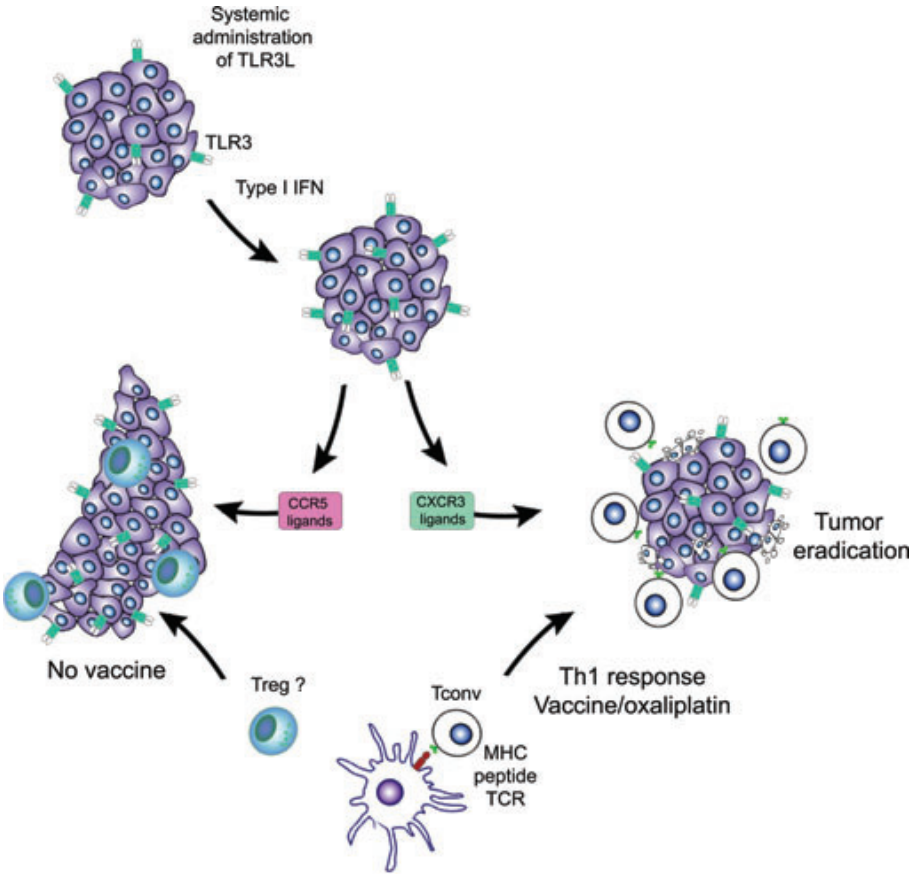


Figure 4. **Putative scenario unraveling the dual role of TLR3L on cancer. Some tumor epithelia may express basal levels of TLR3. Upon systemic administration of TLR3 agonists, type I IFN is produced by the host (in a TRIF-dependent manner), acting on type I IFNR-expressing tumor cells to augment the TLR3 expression. This threshold of TLR3 signaling in tumor cells promotes the production of several chemokines, including CCL5 and CXCL10. CCL5 stimulates CCR5-expressing immunosuppressors, while CXCL10 stimulates CXCR3 expressing immune effectors, presumably IFN-γ–producing CTL (elicited by a vaccine or an immunogenic treatment). As a result, the inhibition of CCR5 with MetRantes has a beneficial effect on the efficacy of TLR3-based immunochemotherapies.**

mice or anti-CXCL10 Abs—abolished the beneficial effects of the tri-therapy.[50] These results indicate that poly(A:U) elicits two opposing effects at the level of the tumor parenchyma: one beneficial through CXCR3 and one deleterious through CCR5 that need to be uncoupled to boost the efficacy of immunochemotherapy.[50] The conceivable scenario is that tumor vaccine and oxaliplatinum act in concert to induce potent antitumor CXCR3 expressing Tc1 responses that are recruited into tumor beds through a direct activity of poly (A:U) onto TLR3 expressing tumor cells (Fig. 4).

Conclusion

The comprehensive understanding of the molecular mechanisms underlying the immunological efficacy of chemotherapy may have several consequences on the future management of cancer patients. First, we will subcategorize the drugs mediating or not mediating an immunogenic cell-death pathway (preferentially among those triggering an ER stress response). Second, we will analyze tumor signatures associated with an immunogenic cell-death pathway (i.e., markers such as CDAMPs that should be expressed by tumor cells during chemotherapy) that enable the diagnosis of susceptible versus resistant tumor parenchyma to an immune contribution after the cytotoxic hit. Third, we will draw a cartography of all the immune defects at the level of the receptors for CDAMPs (designed from SNPs or CNVs) that preclude optimal response to chemotherapy. Finally, we should be able to select the best adjuvants synergizing with immunogenic chemotherapy in hosts

bearing functional immune systems or to design targeted compounds to compensate for immune defects hampering the immunological properties of chemotherapy.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Rosenberg, S.A. *et al*. 1988. Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. *N. Engl. J. Med.* **319:** 1676–1680.
2. Kenter, G.G. *et al*. 2009. Vaccination against HPV-16 oncoproteins for vulvar intraepithelial neoplasia. *N. Engl. J. Med.* **361:** 1838–1847.
3. Hodi, F.S. *et al*. 2010. Improved survival with Ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N. Engl. J. Med.* **363:** 711–723.
4. Dendreon. 2006. Sipuleucel-T: APC 8015, APC-8015, prostate cancer vaccine–Dendreon. *Drugs R. D.* **7:** 197–201.
5. Zitvogel, L. *et al*. 2008. Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* **8:** 59–73.
6. Haynes, N.M. *et al*. 2008. Immunogenic anti-cancer chemotherapy as an emerging concept. *Curr. Opin. Immunol.* **20:** 545–557.
7. Zitvogel, L. & G. Kroemer. 2009. Anticancer immunochemotherapy using adjuvants with direct cytotoxic effects. *J. Clin. Invest.* **119:** 2127–2130.
8. Ma, Y. *et al*. 2010. Chemotherapy and radiotherapy: cryptic anticancer vaccines. *Semin. Immunol.* **22:** 113–124.
9. Obeid, M. *et al*. 2007. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat. Med.* **13:** 54–61.
10. Apetoh, L. *et al*. 2007. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat. Med.* **13:** 1050–1059.
11. Ghiringhelli, F. *et al*. 2009. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors. *Nat. Med.* **15:** 1170–1178.
12. Zitvogel, L., O. Kepp & G. Kroemer. 2010. Decoding cell death signals in inflammation and immunity. *Cell* **140:** 798–804.
13. Zitvogel, L. *et al*. 2008. The anticancer immune response: indispensable for therapeutic success? *J. Clin. Invest.* **118:** 1991–2001.
14. Schulz, O. *et al*. 2005. Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells. *Nature* **433:** 887–892.
15. Albert, M.L., B. Sauter & N. Bhardwaj. 1998. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* **392:** 86–89.
16. Kepp, O. *et al*. 2009. Immunogenic cell death modalities and their impact on cancer treatment. *Apoptosis* **14:** 364–375.
17. Locher, C. *et al*. 2009. Witch hunt against tumor cells enhanced by dendritic cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1174:** 51–60.
18. Aymeric, L. *et al*. 2010. Tumor cell death and ATP release prime dendritic cells and efficient anticancer immunity. *Cancer Res.* **70:** 855–858.
19. Basu, S. & P.K. Srivastava. 1999. Calreticulin, a peptide-binding chaperone of the endoplasmic reticulum, elicits tumor- and peptide-specific immunity. *J. Exp. Med.* **189:** 797–802.
20. Maattanen, P. *et al*. 2006. ERp57 and PDI: multifunctional protein disulfide isomerases with similar domain architectures but differing substrate-partner associations. *Biochem. Cell Biol.* **84:** 881–889.
21. Panaretakis, T. *et al*. 2009. Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death. *EMBO J.* **28:** 578–590.
22. Obeid, M. *et al*. 2007. Ecto-calreticulin in immunogenic chemotherapy. *Immunol. Rev.* **220:** 22–34.
23. Obeid, M. *et al*. 2007. Leveraging the immune system during chemotherapy: moving calreticulin to the cell surface converts apoptotic death from "silent" to immunogenic. *Cancer Res.* **67:** 7941–7944.
24. Andersson, U. *et al*. 2002. HMGB1 as a DNA-binding cytokine. *J. Leukoc. Biol.* **72:** 1084–1091.
25. Bell, C.W. *et al*. 2006. The extracellular release of HMGB1 during apoptotic cell death. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **291:** C1318–C1325.
26. Shiratsuchi, A. *et al*. 2004. Inhibitory effect of Toll-like receptor 4 on fusion between phagosomes and endosomes/lysosomes in macrophages. *J. Immunol.* **172:** 2039–2047.
27. Martinon, F. *et al*. 2007. NALP inflammasomes: a central role in innate immunity. *Semin. Immunopathol.* **29:** 213–229.
28. Tschopp, J., F. Martinon & K. Burns. 2003. NALPs: a novel protein family involved in inflammation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4:** 95–104.
29. Agostini, L. *et al*. 2004. NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity* **20:** 319–325.
30. Poyet, J.L. *et al*. 2001. Identification of Ipaf, a human caspase-1-activating protein related to Apaf-1. *J. Biol. Chem.* **276:** 28309–28313.
31. Martinon, F., K. Burns & J. Tschopp. 2002. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol. Cell.* **10:** 417–426.
32. Franchi, L. *et al*. 2007. Differential requirement of P2×7 receptor and intracellular K+ for caspase-1 activation induced by intracellular and extracellular bacteria. *J. Biol. Chem.* **282:** 18810–18818.
33. Sluyter, R., A.N. Shemon & J.S. Wiley. 2004. Glu496 to Ala polymorphism in the P2×7 receptor impairs ATP-induced IL-1 beta release from human monocytes. *J. Immunol.* **172:** 3399–3405.
34. Jaiswal, S. *et al*. 2009. CD47 is upregulated on circulating hematopoietic stem cells and leukemia cells to avoid phagocytosis. *Cell* **138:** 271–285.
35. Majeti, R. *et al*. 2009. CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells. *Cell* **138:** 286–299.
36. Frey, B. *et al*. 2009. AnnexinA5 renders dead tumor cells immunogenic-implications for multimodal cancer therapies. *J. Immunotoxicol* **6:** 209–216.

Published March 7, 2011

JEM

Article

Contribution of IL-17–producing γδ T cells to the efficacy of anticancer chemotherapy

Yuting Ma,[1,6] Laetitia Aymeric,[1,6] Clara Locher,[1,6] Stephen R. Mattarollo,[8] Nicolas F. Delahaye,[1] Pablo Pereira,[9] Laurent Boucontet,[9] Lionel Apetoh,[10,11,12] François Ghiringhelli,[10,11,12] Noëlia Casares,[13] Juan José Lasarte,[13] Goro Matsuzaki,[14] Koichi Ikuta,[15] Bernard Ryffel,[16] Kamel Benlagha,[17] Antoine Tesnière,[2] Nicolas Ibrahim,[5] Julie Déchanet-Merville,[18] Nathalie Chaput,[1,3] Mark J. Smyth,[8] Guido Kroemer,[2,4,19,20,21] and Laurence Zitvogel[1,3,7]

[1]Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U1015, [2]INSERM U848, [3]Center of Clinical Investigations in Biotherapies of Cancer (CICBT) 507, [4]Metabolomics Platform, [5]Department of BioPathology, Institut Gustave Roussy, 94800 Villejuif, France
[6]École Doctorale de Cancérologie de l'Universite Paris-Sud XI, 94800 Villejuif, France
[7]Faculté de Médecine de l'Université Paris-Sud XI, 94270 Le Kremlin-Bicêtre, France
[8]Cancer Immunology Program, Peter MacCallum Cancer Centre, East Melbourne, 3002, Victoria, Australia
[9]Développement des Lymphocytes, INSERM U668, Institut Pasteur, 75015 Paris, France
[10]INSERM U866, 21000 Dijon, France
[11]Department of Medical Oncology, Georges François Leclerc Center, 21000, Dijon, France
[12]Faculty of Medicine and Pharmacy, University of Burgundy, 21000 Dijon, France
[13]Division of Hepatology and Gene Therapy, Centre for Applied Medical Research (CIMA), University of Navarra, 31008 Pamplona, Spain
[14]Molecular Microbiology Group, COMB, Tropical Biosphere Research Center, University of the Ryukyus, Okinawa 903-0213, Japan
[15]Laboratory of Biological Protection, Department of Biological Responses, Institute for Virus Research, Kyoto University, Kyoto 606-8507, Japan
[16]Molecular Immunology and Embryology, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), IEM 2815, 45071 Orléans, France
[17]INSERM Unité 561/Groupe AVENIR, Hôpital Cochin St. Vincent de Paul, Université Descartes, 75014 Paris, France
[18]CNRS, UMR 5164, Université Bordeaux 2, 33076 Bordeaux, France
[19]Centre de Recherche des Cordeliers, 75006 Paris, France
[20]Pôle de Biologie, Hôpital Européen Georges Pompidou, AP-HP, 75015 Paris, France
[21]Faculté de Médecine, Université Paris René Descartes, Paris, France

By triggering immunogenic cell death, some anticancer compounds, including anthracyclines and oxaliplatin, elicit tumor-specific, interferon-γ–producing CD8$^+$ αβ T lymphocytes (Tc1 CTLs) that are pivotal for an optimal therapeutic outcome. Here, we demonstrate that chemotherapy induces a rapid and prominent invasion of interleukin (IL)-17–producing γδ (Vγ4$^+$ and Vγ6$^+$) T lymphocytes (γδ T17 cells) that precedes the accumulation of Tc1 CTLs within the tumor bed. In T cell receptor δ$^{-/-}$ or Vγ4/6$^{-/-}$ mice, the therapeutic efficacy of chemotherapy was compromised, no IL-17 was produced by tumor-infiltrating T cells, and Tc1 CTLs failed to invade the tumor after treatment. Although γδ T17 cells could produce both IL-17A and IL-22, the absence of a functional IL-17A–IL-17R pathway significantly reduced tumor-specific T cell responses elicited by tumor cell death, and the efficacy of chemotherapy in four independent transplantable tumor models. Adoptive transfer of γδ T cells restored the efficacy of chemotherapy in IL-17A$^{-/-}$ hosts. The anticancer effect of infused γδ T cells was lost when they lacked either IL-1R1 or IL-17A. Conventional helper CD4$^+$ αβ T cells failed to produce IL-17 after chemotherapy. We conclude that γδ T17 cells play a decisive role in chemotherapy-induced anticancer immune responses.

CORRESPONDENCE
Laurence Zitvogel:
zitvogel@igr.fr
OR
Guido Kroemer:
kroemer@orange.fr

Abbreviations used: AhR, aryl hydrocarbon receptor; BMDC, BM-derived DC; CIg, isotype control Ig; DX, doxorubicin; γδ T17, IL-17A–producing γδ T cell; MTX, mitoxantrone; OX, oxaliplatin; Tc1, IFN-γ–producing CD8$^+$ T cell; TIL, tumor-infiltrating lymphocyte; TR, tumor regression.

The current management of cancer patients relies upon the therapeutic use of cytotoxic agents that are supposed to directly destroy cancer cells through a diverse array of cell death pathways.

© 2011 Ma et al. This article is distributed under the terms of an Attribution–Noncommercial–Share Alike–No Mirror Sites license for the first six months after the publication date (see http://www.rupress.org/terms). After six months it is available under a Creative Commons License (Attribution–Noncommercial–Share Alike 3.0 Unported license, as described at http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/).

The Rockefeller University Press $30.00
J. Exp. Med. Vol. 208 No. 3 491-503
www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.20100269

Supplemental Material can be found at:
http://jem.rupress.org/content/suppl/2011/03/04/jem.20100269.DC1.html

The Journal of Experimental Medicine

Downloaded from jem.rupress.org on May 8, 2012

Published March 7, 2011

JEM

Nonetheless, several lines of evidence point to a critical contribution of the host immune system to the therapeutic activity mediated by tumoricidal agents (Nowak et al., 2002, 2003). Indeed, in some instances, the cell death triggered by chemotherapy or radiotherapy allows recognition of dying (anthracycline-treated or irradiated) tumor cells by antigen-presenting cells, thus eliciting a tumor-specific cognate immune response for tumor resolution. Whether cell death is immunogenic or not depends on the presence of tumor-specific antigens, as well as on the lethal hit. Thus, oxaliplatin (OX) and anthracyclines induce immunogenic cell death, whereas other chemotherapeutic agents such as cisplatin and alkylating agents tend to induce nonimmunogenic cell death (Casares et al., 2005; Obeid et al., 2007). Stressed and dying tumor cells may emit a particular pattern of "danger signals," and these cell death–associated molecules are either exposed on the surface of dying cells or secreted into the microenvironment. The combined action of "find-me" and "eat-me" signals, together with the release of hidden molecules that are usually secluded within live cells may influence the switch between silent corpse removal and inflammatory reactions that stimulate the cellular immune response (Zitvogel et al., 2010). We initially described the crucial importance of an eat-me signal represented by the early translocation of the endoplasmic reticulum resident calreticulin–ERp57 complex to the plasma membrane for the immunogenicity of tumor cell death (Obeid et al., 2007; Panaretakis et al., 2008, 2009). Next, we showed that the nuclear alarmin HMGB1 must be released into the tumor microenvironment to engage TLR4 on host DCs to facilitate antigen processing and presentation (Apetoh et al., 2007). We also reported that ATP released from dying tumor cells could trigger the purinergic P2RX7 receptor on host DC, stimulating the release of IL-1β, which in turn facilitates the priming of $CD8^+$ tumor-specific T cells for IFN-γ production that is indispensable for the success of chemotherapy (Ghiringhelli et al., 2009).

Although the contribution of IFN-γ to tumor surveillance and anticancer immune responses is clearly established, that of the IL-17A–IL-17R pathway remains controversial (Martin-Orozco and Dong, 2009; Muranski and Restifo, 2009; Ngiow et al., 2010). In tumor models where $CD4^+$ T cells are the source of IL-17, this cytokine could induce Th1-type chemokines, recruiting effector cells to the tumor microenvironment (Kryczek et al., 2009) or promote IL-6–mediated Stat3 activation, acting as a protumorigenic trigger (Kortylewski et al., 2009; Wang et al., 2009). Tumor-specific Th17 exhibited stronger therapeutic efficacy than Th1 cells upon adoptive transfer, and converted into effective IFN-γ producers (Muranski et al., 2008) and/or triggered the expansion, differentiation, and tumor homing of tumor-specific $CD8^+$ T cells (Martin-Orozco et al., 2009). IL-17–producing $CD8^+$ T cells also reduced the volume of large established tumors and could differentiate into long-lasting IFN-γ producers (Hinrichs et al., 2009). In contrast, Kwong et al. (2010) described a tumor-promoting, IL-17–producing TCR $\alpha\beta^+CD8^+$ cell subset. Therefore, the heterogeneous source (and perhaps the targets) of IL-17 in the tumor microenvironment may determine whether this cytokine negatively or positively affects tumor growth. Whether conventional anticancer therapies such as chemotherapy and radiotherapy modulate IL-17 secretion and/or Th17 polarization remains to be explored (Maniati et al., 2010).

Similarly, the contribution of γδ T cells in tumor immunosurveillance is still elusive (Hayday, 2009). In humans, $V\delta1^+$ γδ T cells have been shown to mediate immunosuppressive activities (Peng et al., 2007) or, on the contrary, to be associated with a reduced occurrence of cancers in transplanted patients bearing a CMV infection (Déchanet et al., 1999; Couzi et al., 2010) and with long-term relapse-free survival after BM transplantation (Godder et al., 2007). $V\delta2^+$ γδ T cells can be activated by various synthetic ligands to produce Th1-like cytokines, exhibit cytotoxic functions against tumors (Kabelitz et al., 2007), and mediate antitumor effects in patients (Wilhelm et al., 2003; Dieli et al., 2007). Although various γδ T cell subsets are capable of producing IL-17 during microbial infection or autoimmune disorders of mice (Shibata et al., 2007; O'Brien et al., 2009), very little is known about the incidence and functional relevance of IL-17–producing γδ T cells (that we termed γδ T17) in cancer (Gonçalves-Sousa et al., 2010). γδ T17 cells have been reported to share most phenotypic markers with Th17 cells (expressing CCR6, RORγt, aryl hydrocarbon receptor [AhR], IL-23R, IL-17A, and IL-22; Martin et al., 2009). γδ T17 cells depend upon TGF-β but not IL-23 or IL-6 for their development and maintenance (Do et al., 2010) and can be activated by IL-1β plus IL-23 (Sutton et al., 2009). They are unrestricted by Vγ usage (although they are mostly Vγ4 in the context of mycobacteria [Martin et al., 2009] and experimental autoimmune encephalitis [Sutton et al., 2009]). Recent work suggests that thymic selection does little to constrain γδ T cell antigen specificities, but instead determines their effector fate. When triggered through the TCR, ligand-experienced cells secrete IFN-γ, whereas ligand-naive γδ T cells produce IL-17 (Jensen et al., 2008). $CD27^+$ γδ thymocytes expressed LTβR and genes associated with a Th1 phenotype, in contrast to $CD27^-$ γδ thymocytes which give rise to IL-17–producing γδ cells (Ribot et al., 2009).

Therapy-induced immunogenic tumor cell death that stimulates a therapeutic anticancer immune response can be expected to influence the composition and/or the architecture of tumor immune infiltrates, which in turn contribute to the control of residual tumor cells. Here, we demonstrate that both IL-17A/IL-17RA signaling and γδ T cells are required for optimal anticancer responses and that the source of IL-17A is the γδ T population during immunogenic chemotherapy and radiotherapy. We show that an early tumor infiltration by γδ T17 cells is a prerequisite for optimal tumor colonization of IFN-γ–producing $CD8^+$ T cells. γδ T cell activation depends on IL-1R1 and IL-1β (but not IL-23) produced by DCs in response to immunogenic dying tumor cells. Finally, the adoptive transfer of WT γδ T17 cells can restore the therapeutic efficacy of anticancer chemotherapy that is compromised in IL-$17A^{-/-}$ hosts.

Downloaded from jem.rupress.org on May 8, 2012

Published March 7, 2011

RESULTS

A marked Th1 pattern 8 d after chemotherapy

Anthracyclines induce immune responses that culminate in $CD8^+$ T cell– and IFN-γ/IFN-γR–dependent antitumor effects (Ghiringhelli et al., 2009). To further study chemotherapy-induced immune effectors at the site of tumor retardation, we performed quantitative RT-PCR to compare the transcription profile of 40 immune gene products expressed in MCA205 tumors, which were controlled by the anthracycline doxorubicin (DX) 8 d after treatment (Fig. 1 A, top), with that of progressing, sham-treated (PBS) tumors (Fig. 1 A, bottom). Several Th1-related gene products were specifically induced in regressing tumors (Fig. 1 B). In particular, the Th1 transcription factors Eomes and Tbx21 (also called T-bet) and their target, IFN-γ, were increased by 4–5 fold in DX versus PBS-treated tumors (Fig. 1 C, left). Unsupervised hierarchical clustering indicated that IFN-γ production correlated with that of the quintessential Th1 transcription factor, Tbx21. By day 8, the protein levels of IFN-γ also increased in DX-treated MCA205 sarcomas (Fig. 1 D, left). Other surrogate markers of Th1 responses (lymphotoxin-β, Ccl5, Cxcl10, Cxcl9, and TNF) were also significantly induced at the mRNA level after DX treatment (Fig. 1, B and C, left). Another set of gene products was also overexpressed in the context of DX-induced tumor regression. These genes encoded IL-7R, IL-21, AhR, Cxcl2, and Foxp3, suggesting that inflammation and/or tissue repair occurred in the tumor bed (Fig. 1, B and C, right). Indeed, by day 3 after chemotherapy, the protein levels of the inflammatory cytokine IL-17 were significantly increased within tumor homogenates (Fig. 1 D, right).

Reinforcing this finding, we found that AhR, a sensor of small chemical compounds, is involved in the success of anthracycline-based therapy in this model. AhR is recognized as a transcriptional regulator for the optimal IL-17–associated immune response, promoting the differentiation and/or maintenance of IL-17–producing cells (Esser et al., 2009). CH-223191 is a pure antagonist of AhR because it does not have any agonist actions up to 100 μM (Kim et al., 2006). Blocking AhR with CH-223191 markedly reduced the efficacy of DX on established cancers in vivo (Fig. S1 A). This contrasts with the observation that CH-223191 had no cell autonomous effects on the tumor cells, alone or in combination with anthracyclines (Fig. S1 B).

DX (compared with PBS) induced a threefold increase in the proportions of both IFN-γ– and IL-17–producing tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) as tested by flow cytometry (FACS; Fig. 1 E). To identify the cellular source of IFN-γ and IL-17, TILs were immunophenotyped by cell surface staining and intracellular detection of the cytokines with FACS. Careful analyses revealed that the major source of IFN-γ was $CD8^+$ T cells, whereas that of IL-17 was mostly TCR δ^+ T cells rather than $CD4^+$ Th17 cells 8 d after chemotherapy in MCA205 sarcomas (Fig. 1 F). We further analyzed the IFN-γ and IL-17 production by each subset of TILs. $CD4^+$ T cells could secrete IFN-γ, but rarely IL-17. $CD8^+$ T and γδ T cells were polarized to become potent producers of IFN-γ and IL-17, respectively. DX-based chemotherapy substantially enhanced IFN-γ production by $CD8^+$ and $CD4^+$ TILs, as well as IL-17 production by γδ TILs (Fig. 1 G).

γδ T17 cells preceded and predicted the accumulation of Tc1 CTLs in tumor beds after chemotherapy

Kinetic experiments revealed that γδ TILs invaded MCA205 tumor beds and produced IL-17 shortly after chemotherapy, with significant increases (~9-fold) over the background 4 d after DX injection (Fig. 2 A, left). γδ TILs still rapidly divided (as indicated by the expression of Ki67) 8 d after DX treatment (Fig. 2 B). This early induction of IL-17–producing γδ T cells (Fig. 2 C, left) contrasted with the comparatively late induction of IFN-γ–producing $CD8^+$ T cells, which emerged sharply 8 d after chemotherapy (Fig. 2 C, right) and rapidly proliferated (Fig. 2 B). Altogether, anthracyclines induced an early Th17-biased inflammation together with a marked Th1 polarization in MCA205 tumor beds, associated with a brisk infiltration of γδ T17 cells followed by Tc1 effectors.

To generalize these findings, we systematically immunophenotyped TILs in CT26 colon cancer treated by a single intratumoral injection of DX, which significantly retarded tumor growth (Fig. 3 A). Indeed, the majority of $IL\text{-}17A^+$ TILs were $CD45^+CD3^{bright}$. They failed to express CD4, but were positively stained with anti-TCR δ–specific antibodies (Fig. S2 A). Consistently, chemotherapy dramatically increased the frequency of IFN-γ–producing $CD8^+$ T lymphocytes (Tc1; Fig. 3 B) and IL-17A–producing γδ T cells (γδ T17; Fig. 3 C) in the tumor microenvironment. Next, we monitored transplantable TS/A mammary carcinomas treated with local radiotherapy, which operates in a T cell–dependent manner (Apetoh et al., 2007). Irradiation of TS/A tumors led either to tumor regression or to no response, and hence tumor progression (Fig. 3 D). An accumulation of both Tc1 (Fig. 3 E) and γδ T17 (Fig. 3 F) lymphocytes was found in those tumors that responded to radiotherapy, but not in those that continued to progress or in untreated controls. Importantly, in each of the three tumor models that we tested, a clear correlation was observed between tumor invading γδ T17 and Tc1 cells (Fig. 3 G).

γδ T17 TILs were preponderantly $CD44^+$ $CD62L^-$ $CD69^+$ and Granzyme B^+. They did not express CD24, c-kit, NKG2D, CD27 (a thymic determinant for IFN-γ–producing γδ T cells; Ribot et al., 2009), SCART2 (a specific marker for peripheral IL-17–producing cells which can be down-regulated upon activation; Kisielow et al., 2008), or CD122 (a marker for self antigen-experienced γδ T cells with potential to produce IFN-γ (Jensen et al., 2008; unpublished data). FACS indicated that ~60% of γδ T17 used Vγ4 chain (nomenclature of Vγ genes according to Heilig and Tonegawa [1986]), but expression of Vγ1 and Vγ7 chain was rarely found (Fig. S2 B). We then sorted $V\gamma1^-V\gamma4^-V\gamma7^-$ γδ T17 TILs (Fig. S2 C) and performed single-cell PCRs and sequencing (Pereira and Boucontet, 2004) to examine their Vγ chain usage. The majority of these cells (21 of 23 clones) contained functional

Downloaded from jem.rupress.org on May 8, 2012

Published March 7, 2011

JEM

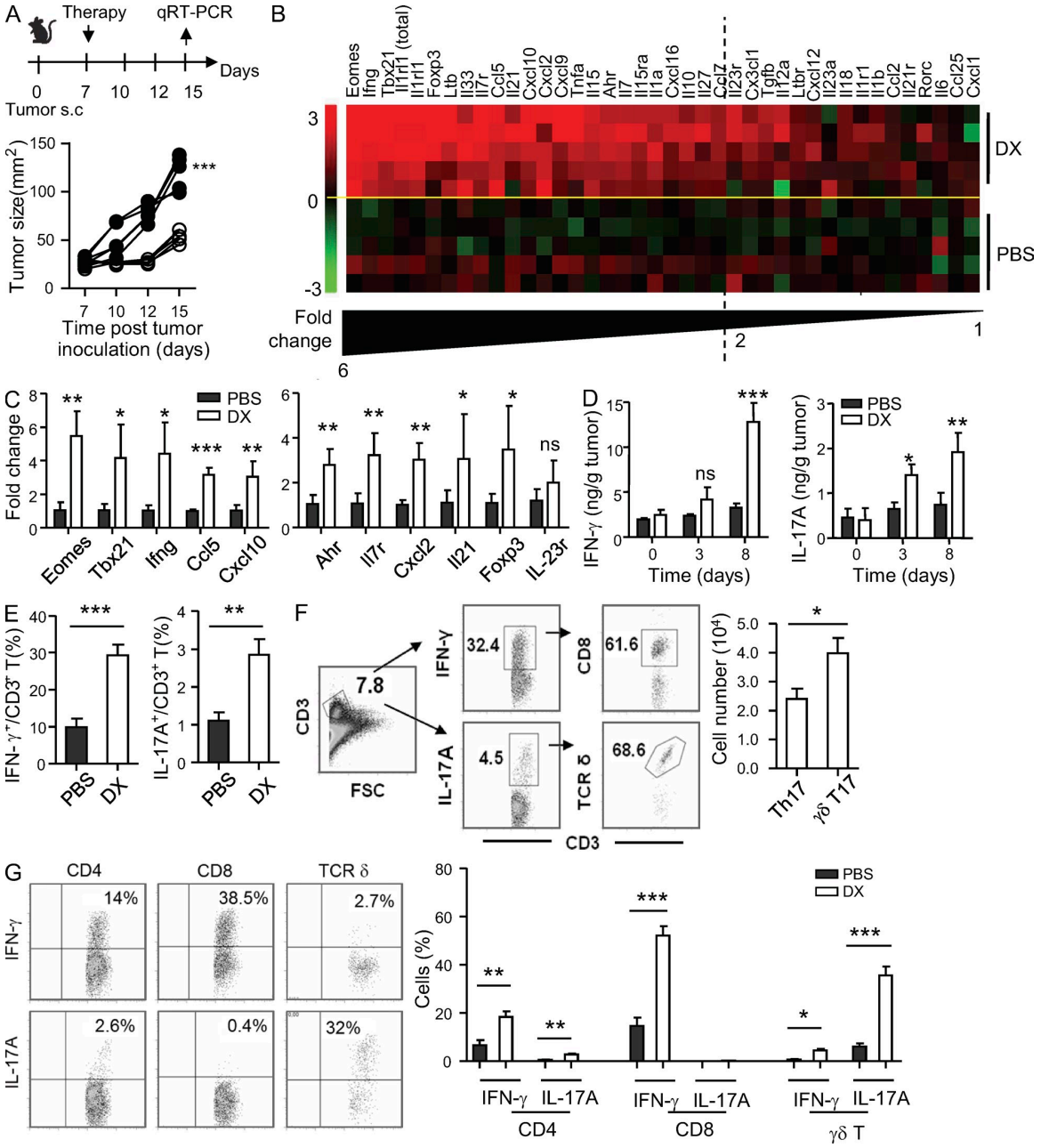


Figure 1. Th1 and Th17 immune response in tumors after chemotherapy. (A) Mice bearing MCA205 tumors were treated with PBS (solid symbols) or DX (open symbols) intratumorally at day 7 after tumor inoculation. Tumor growth was monitored at the indicated time points. (B and C) 8 d after chemotherapy (day 15 after tumor inoculation), tumor homogenates in PBS and DX groups were tested by quantitative RT-PCR (qRT-PCR). (B) Fold changes of gene expression are shown as a heat map. (C) Th1- and Th17-related gene expression in DX versus PBS groups (with a fold change >2) are listed. (D) Measurements of IFN-γ and IL-17A protein in tumor homogenates by ELISA at the indicated time points. (E and F) Single-cell suspension of MCA205 tumors (day 8 after DX) were analyzed by FACS. (E) Expression of IFN-γ and IL-17A in TILs was tested by intracellular staining gated on live, CD45$^+$ and CD3$^+$ cells. (F) IFN-γ$^+$ and IL-17A$^+$ cells were gated, and the proportions of CD3$^+$ CD8$^+$ cells and CD3$^+$ TCR δ$^+$ cells were examined in DX-treated tumors. A typical dot plot analysis (left) and the absolute numbers of Th17 and γδ T17 cells in the whole tumors (right) are shown. (G) IFN-γ and IL-17A production by total CD4$^+$, CD8$^+$, and TCR δ$^+$ TILs. Representative FACS plots in DX-treated tumors (left) and the percentages in PBS- or DX-treated tumors (right) are shown. Each group contained at least five mice, and each experiment was performed at least twice, yielding similar results. Graphs depict mean ± SEM of fold change of gene expression (C), protein content (D), percentages, or absolute numbers of positive cells (E and G). *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

Downloaded from jem.rupress.org on May 8, 2012

Published March 7, 2011

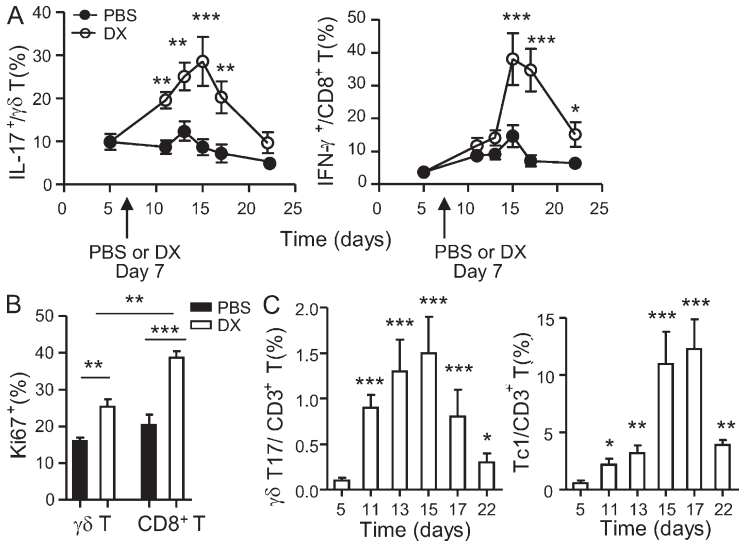


Figure 2. γδ T17 cells preceded Tc1 CTL into tumors after chemotherapy. (A) The percentages of IL-17– and IFN-γ–producing cells among all tumor infiltrating γδ T cells and $CD8^+$ T cells, respectively, are plotted before and at the indicated time points after tumor inoculation. Mice were treated with PBS (filled symbols) or DX (open symbols) at day 7. (B) Ki67 expression on γδ T and $CD8^+$ TILs 8 d after treatment. (C) The percentages of γδ T17 and Tc1 among all $CD3^+$ TILs at the indicated time points after tumor inoculation. DX was given at day 7. These experiments were performed twice on 5–10 tumors at each time point. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

Vγ6 rearrangements identical to those found in fetal γδ T cells (Lafaille et al., 1989). These experiments show that most γδ T17 TILs express Vγ4 or Vγ6 chains (Fig. S2, D and E).

Thus, chemotherapy and radiotherapy could trigger the accumulation of cytokine producing TILs in the tumor bed. This applies to distinct subsets of γδ T cells that rapidly invaded tumor and become IL-17 producers, correlating with the accumulation of Tc1 cells, which contribute to the chemotherapy-induced anticancer immune response.

The IL-17A–IL-17R pathway is involved in the immunogenicity of cell death

Because both Tc1 and γδ T17 cells accumulated within tumors after chemotherapy or radiotherapy in a coordinated fashion, we determined whether neutralizing their signature cytokines IFN-γ and IL-17A could mitigate the efficacy of anticancer therapies. Antibody-mediated neutralization of either IFN-γ or IL-17A negatively affected the growth-retarding effect of DX against MCA205 tumors (Fig. 4 A). The mandatory role of the IL-17A–IL-17RA pathway was confirmed using neutralizing anti–IL-17RA antibodies and IL-$17A^{-/-}$ mice in the same tumor model (Fig. 4 B), in DX-treated MCA2 sarcomas (Fig. 4 C), as well as in OX-treated, OVA-expressing EG7 thymomas or CT26 colon cancers (Fig. 4, D and E).

To rationalize the sequential recruitment of γδ T17 and Tc1 cells into the tumor bed after chemotherapy, we hypothesized that γδ T17 might act as helper cells for Tc1 priming. We previously reported that specific antitumor immune responses rely on Tc1 cells primed by tumor cells undergoing immunogenic cell death by using a system in which IFN-γ production by OVA-specific T cells could be triggered by OX-treated EG7 cells (Ghiringhelli et al., 2009). We used this system to check whether IL-17 is involved in initiating the specific antitumor response, comparing normal WT with IL-$17RA^{-/-}$ mice. In this assay, the absence of IL-17RA fully abolished antigen-specific T cell priming in response to dying cells, yet had no negative effect on T cell priming by OVA holoprotein admixed with CpG oligodeoxynucleotides (Fig. 5 A, left). Consistently, a neutralizing anti–IL-17A antibody, but not the isotype control Ig (CIg), markedly impaired the OVA-specific T cell induced by OX-treated EG7 (Fig. 5 A, right). Because Th1/Tc1 immune responses against dying tumor cells mediate a prophylactic protection against rechallenge with live tumor cells (Apetoh et al., 2007; Ghiringhelli et al., 2009), we addressed the functional relevance of the IL-17A–IL-17RA pathway in this setting. Subcutaneous injection of mitoxantrone (MTX)-treated MCA205 sarcoma cells could protect WT mice, but not athymic nude mice, against rechallenge with live MCA205 tumor cells (Fig. 5 B). The efficacy of this vaccination was attenuated in IL-$17RA^{-/-}$ mice. Because IL-17 was not significantly produced by $CD4^+$ or $CD8^+$ T cells, neither in tumor beds during chemotherapy (Fig. 1 G) nor in the tumor draining LNs (unpublished data), we refrained from investigating Th17 cells and rather focused on γδ T and NKT cells as potential IL-17 producers (Mills, 2008; Pichavant et al., 2008) that might contribute to the anticancer vaccination by dying tumor cells. Although $CD1d^{-/-}$ mice, which lack all NKT population (Godfrey et al., 2010), were undistinguishable from WT controls in their ability to resist live tumor cells rechallenge after a dying tumor cell vaccine, $V\gamma4/6^{-/-}$ mice (Sunaga et al., 1997) exhibited a reduced capacity to mount this anticancer immune response (Fig. 5 B). These results suggest that IL-17A, IL-17R, and γδ T17 cells all play a partial role in the afferent phase of the immune response against dying tumor cells, which includes T cell priming for IFN-γ production.

IL-1β–dependent, but not IL-23–dependent, activation of γδ T lymphocytes

The IL-1β–IL-1R1 pathway is mandatory for eliciting Tc1 immune responses and for the efficacy of chemotherapy (Ghiringhelli et al., 2009). Moreover, we found an IL-1–related gene expression signature after chemotherapy in tumor beds (Fig. 1 B), prompting us to address its role in the activation of γδ T17 cells.

To explore the molecular requirements for γδ T17 activation in situ, we sorted γδ T cells from the skin-draining LNs

Downloaded from jem.rupress.org on May 8, 2012

Published March 7, 2011

JEM

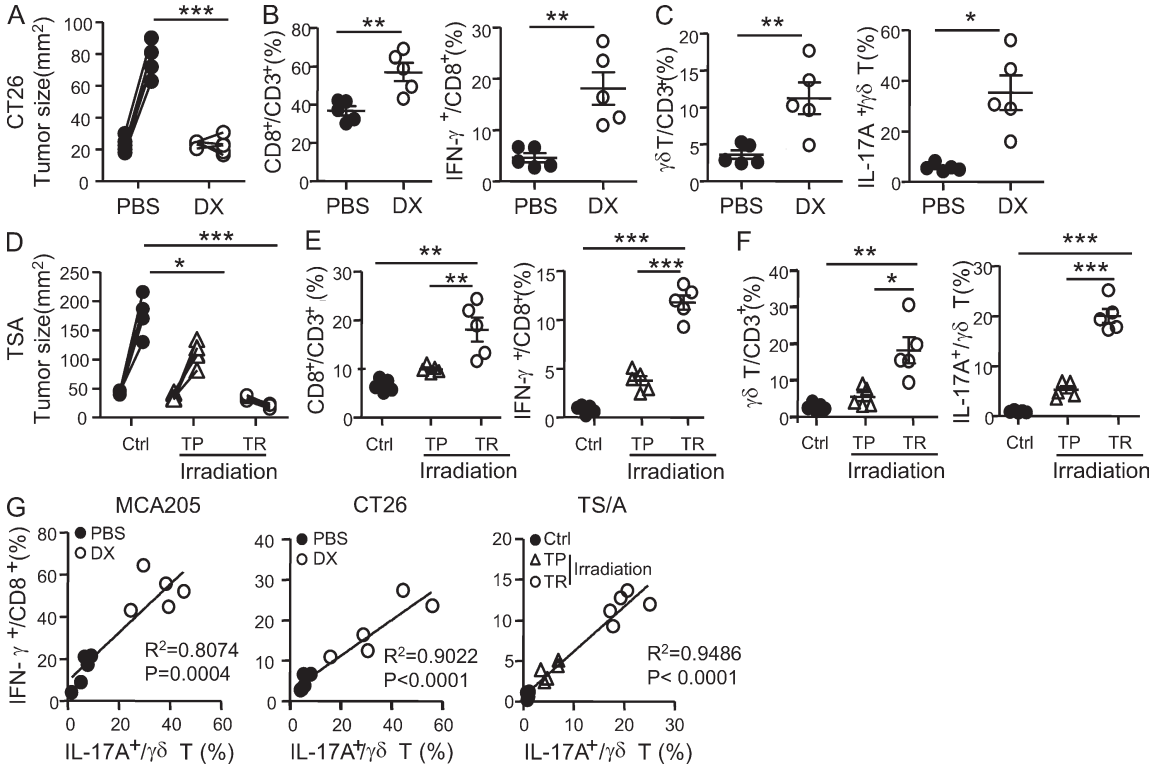


Figure 3. Recruitment of both Tc1 and γδ T17 cells in CT26 and TS/A tumors that correlate with better tumor control. (A–C) CT26 colon cancer treated with anthracyclines. (A) Tumor size before and 8 d after treatment with PBS (filled symbols) or DX (open symbols). (B) The percentage of $CD8^+$ T cells among $CD3^+$ cells and of IFN-γ–producing cells among $CD8^+$ T cells. (C) The percentage of γδ T cells among $CD3^+$ cells and of IL-17A–producing cells among $CD3^+$ γδ T cells. Data are presented as mean ± SEM with five tumors/group. (D–F) TS/A mammary cancer treated with x rays. (D) Established TS/A tumors were treated with local irradiation (open symbols) on day 10. Mice were segregated into nonresponders (tumor progression [TP], triangles) and responders (tumor regression [TR], circles) 22 d after radiotherapy (n = 5). (E) The percentage of $CD8^+$ T cells among $CD3^+$ cells and of IFN-γ-producing cells among $CD8^+$ T cells; (F) The percentage of γδ T cells among $CD3^+$ cells and of IL-17A–producing cells among $CD3^+$ γδ T cells are indicated as mean ± SEM. (G) The correlation between the percentages of γδ T17 and Tc1 TILs in all tumors (treated or not) was plotted for MCA205, CT26, and TS/A tumors (each dot representing one mouse). Data are representative of two to three independent experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

of naive mice (around 1–2% of the LN T cell pool). Among these γδ T cells, ∼70% harbored the Vγ4 TCR. Moreover, these cells vigorously produced IL-17A (but not IFN-γ) upon stimulation with PMA/ionomycin (Fig. S2 F; Do et al., 2010). In contrast to Th17 cells (Ivanov et al., 2006), LN-resident γδ T cells failed to produce IL-17 in response to TGF-β or IL-6 alone, or in combination with IL-1β. However, they potently secreted IL-17 and IL-22 in response to the combined stimulation of IL-1β plus IL-23 (unpublished data; Sutton et al., 2009). TCR engagement also synergized with IL-1β (and to a lesser extent with IL-23) to trigger IL-17 and IL-22 secretion by LN-resident γδ T cells (unpublished data). It is noteworthy that these stimuli specifically activated IL-17A, but not IFN-γ production by γδ T cells. Because γδ T17 cells were activated (as indicated by their $Ki67^+$, GzB^+, $CD69^+$, and $IL\text{-}17^+$ phenotype) after chemotherapy, we addressed whether dying tumor cells could directly promote the activation of γδ T17. Although DX-treated MCA205 cells failed to directly induce IL-17 secretion by γδ T cells, they did so indirectly. Thus, BM-derived DCs (BMDCs) that had been loaded with DX-treated MCA205 (Fig. 5 C; or CT26, not depicted), but not with live tumor cells, produced IL-1β and markedly stimulated the release of IL-17 and IL-22 by γδ T cells (Fig. 5 C). As a quality control for in vitro–generated DCs, the expression of CD11c, MHC class II, CD11b, and F4/80 was assessed. Only qualified DC preparations that contain functional DCs (>80% $CD11c^+MHCII^+$) rather than macrophages (>70% $CD11b^+F4/80^+CD11c^-$) could activate γδ T cells for IL-17A production when they encountered DX-treated tumor cells. $CD11b^+Gr1^+$ neutrophils reportedly produce IL-17 and promote downstream IL-12/IFN-γ contributing to reperfusion injury (Li et al., 2010). Interestingly, $CD11b^+Gr1^+$ cells sorted from DX-treated tumor beds bearing the IL-1β messenger RNA failed to secrete IL-1β or IL-17A protein and failed to activate γδ T cells for IL-17A production in vitro (unpublished data). IL-17 production by γδ T cells was dependent on IL-1β because the IL-1R1 antagonist IL-1RA entirely abrogated the DC/γδ T cell cross talk in the presence

Downloaded from jem.rupress.org on May 8, 2012

Published March 7, 2011

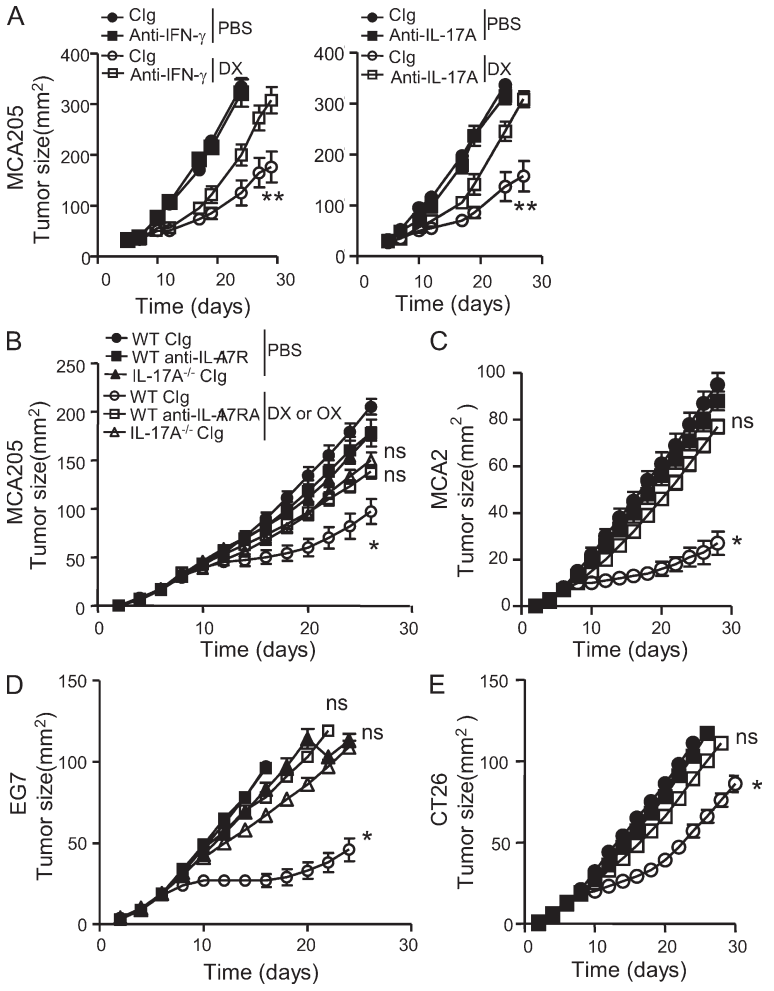


Figure 4. A mandatory role for the IL-17A–IL-17RA pathway in the efficacy of chemotherapy. (A) Mice bearing established MCA205 sarcomas were treated with local PBS (filled symbols) or DX (open symbols) 7 d after tumor inoculation and with systemic neutralizing antibodies against mouse IFN-γ (left), IL-17A (right), or control Ig (Clg) i.p. every 2 d (3 injections, 200 µg/mouse) starting on the day of DX. (B–E) WT (circles or squares) or IL-17A$^{-/-}$ (triangles) mice bearing established MCA205 sarcomas (B), MCA2 (C), EG7 (D), or CT26 (E) tumors were treated with PBS (B-E, solid symbols), DX (B and C, open symbols), or OX (D and E, open symbols) together with systemic administration of neutralizing antibodies against IL-17RA (squares) or Clg. Tumor sizes are plotted as mean ± SEM for 5–15 mice/group, and each experiment was repeated at least 2 times, yielding similar results. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

of dying cells. The neutralization of IL-18R, IL-23, or IL-23R failed to abolish IL-17 production by γδ T cells co-cultured with DCs (Fig. 5 D). IL-22 production was completely abolished by blocking the IL-1β–IL-1R or IL-23–IL-23R pathways but not affected by IL-18R blockade. Interestingly, chemotherapy lost part of its anticancer activity in IL-1R1–deficient mice, yet maintained its efficacy in mice treated with IL-23p19–neutralizing antibodies or in IL-23p19$^{-/-}$ mice (Fig. 5, E–G). IL-1β–activated γδ T cells produced IL-17 and IL-22 (Fig. 5, C and D). However, IL-22 did not play an essential role in the antitumor effects promoted by chemotherapy (Fig. S3 A). It is of note that the antibody we used in this experiment could block the bioactivity of IL-22 in a lung bacterial infection model (Aujla et al., 2008), and IL-22 mRNA in the bulk TILs was below the detection limit of quantitative RT-PCR. Collectively, these results underscore the importance of IL-1β and IL-17 for the immune-dependent anticancer effects of chemotherapy, yet suggest that both IL-23 and IL-22 are dispensable for such effects.

γδ T lymphocytes are indispensable for the immune-dependent effects of chemotherapy

To further evaluate the contribution of γδ T cells to the therapeutic action of DX on established MCA205 sarcomas, such tumors were implanted into age- and sex-matched WT, TCR δ$^{-/-}$, Vγ4/6$^{-/-}$ mice, and then subjected to chemotherapy. As compared with WT controls, the absence of the TCR δ chain, as well as that of Vγ4 and Vγ6 γδ T cells, greatly reduced the efficacy of chemotherapy (Fig. 6 A). At day 8 after chemotherapy, when γδ T17 and Tc1 massively infiltrated tumor beds in WT mice, these cytokine-producing TILs were either absent or greatly reduced in Vγ4/6$^{-/-}$ mice (Fig. 6 B), suggesting that the presence of Vγ4 and Vγ6 γδ T cells are critical for the optimal Tc1 response in tumor beds.

Expression of CCR6 is a phenotypic and functional hallmark of Th17 cells (Reboldi et al., 2009) during some inflammatory processes. We therefore analyzed the role of CCR6 in the efficacy of chemotherapy. Because CCL20 was detectable in tumor tissues before and after chemotherapy (unpublished data), we assessed whether γδ T17 cells could be recruited in a CCL20/CCR6-dependent manner. The tumoricidal activity of DX against CT26 was not affected by repetitive systemic injections of neutralizing anti-CCL20 antibody before and during anthracycline treatment (Fig. S3 B). Consistently, anthracycline treatment against established MCA205 sarcoma remained efficient in CCR6 loss-of-function mice. Moreover, CCR6 deficiency did not influence tumor infiltration by γδ T17 (unpublished data). Therefore, Vγ4 and Vγ6 γδ T cells contribute to the immune-mediated action of anticancer agents in a CCR6-independent fashion.

Next, we determined the contribution of adoptively transferred γδ T cells to the efficacy of chemotherapy. The infusion of γδ T cells derived from skin-draining LNs (from naive

Downloaded from jem.rupress.org on May 8, 2012

Published March 7, 2011

JEM

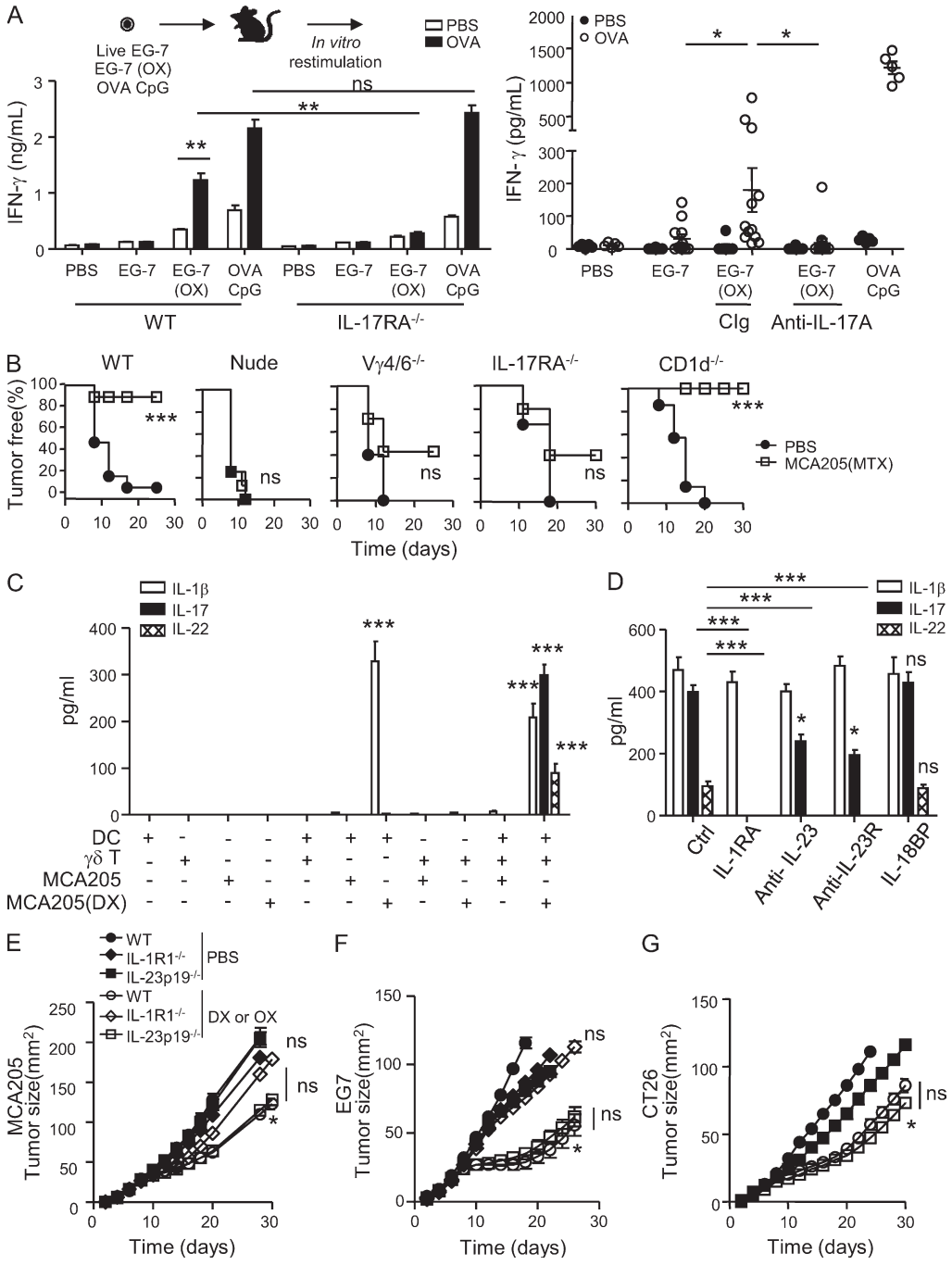


Figure 5. Role of γδ T17 in the priming of T cell responses during an immunogenic cell death and regulation by IL-1β. (A) OX-treated EG-7 cells were inoculated in the footpad of WT versus IL-17RA$^{-/-}$ mice (n = 5; left) along with anti–IL-17A neutralizing antibody (or Clg; right panel). OVA-specific IFN-γ secretion by draining LN cells was measured in vitro by ELISA after stimulation with OVA protein (1 mg/ml). OVA/CpG immunization was used as positive control. (B) Immunization with MTX-treated MCA205 and rechallenge with a tumorigenic dose of live MCA205 were performed at day 0 and day 7, respectively in WT C57Bl6 (n = 10), nude (n = 10), Vγ4/6$^{-/-}$ (n = 15), IL-17RA$^{-/-}$ (n = 8), and CD1d$^{-/-}$ (n = 6) mice. The percentages of tumor-free mice were scored at the indicated time points. Experiments in A and B were performed twice with similar results. (C) Production of IL-1β, IL-17A, and IL-22 from mixed co-cultures of LN-derived γδ T cells and/or BMDCs loaded or not loaded with live or DX-treated MCA205 was monitored by ELISA. Data are shown as mean ± SEM (D) Co-cultures of DX-treated MCA205/BMDC/γδ T were performed in the presence of 20 µg/ml IL-1RA (Amgen), anti–IL-23, or

Downloaded from jem.rupress.org on May 8, 2012

Published March 7, 2011

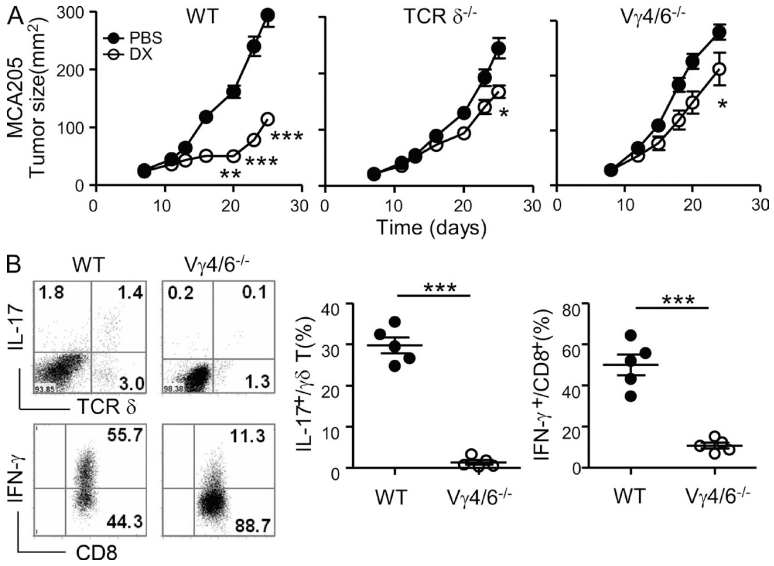


Figure 6. The therapeutic activity of anthracyclines and tumor colonization of Tc1 depend upon Vγ4 Vγ6 γδ T cells. (A) WT, TCR $\delta^{-/-}$, or Vγ4/6$^{-/-}$ mice with established MCA205 tumors were injected intratumorally with PBS or DX. Tumor size was measured at the indicated time and plotted as mean ± SEM (n = 8/group). (B) Percentage of IL-17A– or IFN-γ–expressing cells within CD3$^+$ TCRδ$^+$ and CD3$^+$ CD8$^+$ TILs, respectively, in WT or Vγ4/6$^{-/-}$ mice. A typical dot plot is shown (left) and statistical analysis was performed with combined data from two independent experiments (right). *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$.

WT mice) into tumor beds 2 d after DX potentiated the growth-retarding effect of chemotherapy, yet had no effect on PBS-treated tumors (Fig. 7 A). Importantly, synergistic antitumor effects of DX and adoptively transferred γδ T cells were lost when the γδ T cells were obtained from IL-17A$^{-/-}$ or IL-1R1$^{-/-}$ donors (Fig. 7, B and C), emphasizing the role of IL-1β responses and IL-17 production in the function of γδ T cells. Moreover, the adoptive transfer of WT γδ T cells could restore the antitumor efficacy of chemotherapy in IL-17A–deficient mice (Fig. 7 D). Collectively, these results emphasize the important contribution of γδ T17 cells to the immune-dependent effects of anticancer chemotherapy.

DISCUSSION

Our results highlight a role of γδ T cells, particularly the Vγ4- and Vγ6-expressing subsets that produce the effector cytokine IL-17A, in the anticancer immune response induced by cytotoxic chemotherapeutics. We demonstrated that the IL-17A–IL-17RA signaling pathway is required for the priming of IFN-γ–secreting, antigen-specific T cells by tumor cells exposed to chemotherapy. This tumor-specific, Tc1-mediated immune response is essential for anticancer immunity because the protective effect of dying tumor cell vaccination is lost in athymic nude mice or when CD8$^+$ T cells are depleted (Casares et al., 2005), and chemotherapy fails to work when the IFN-γ–IFN-γR system is blocked (Ghiringhelli et al., 2009). Accordingly, we found that the absence of the IL-17A–IL-17RA pathway reduced the capacity of mice to mount a protective antitumor response.

When exploring the source of IL-17A elicited by dying tumor cells, we found that γδ T cells were the quantitatively and functionally most important IL-17A producers, based on several observations. First, in the context of chemotherapy, IL-17–producing cells accumulated in tumors, and most of them were positive for γδ T markers. Second, antigen-specific CD4$^+$ T cells in LNs draining the dying tumor cells showed a Th1 (IL-2 and IFN-γ) instead of a Th17 cytokine pattern (Ghiringhelli et al., 2009). CD4$^+$ and CD8$^+$ TILs were polarized to produce IFN-γ instead of IL-17. Also, IL-6 and TGF-β, two key regulatory cytokines essential for the differentiation of Th17 cells (Ivanov et al., 2006; Veldhoen et al., 2006), were dispensable for the efficacy of chemotherapy or vaccination with dying tumor cells (Fig. S3, C and D), suggesting that Th17 cells may not be required for the anticancer immune response after chemotherapy. Third, when popliteal LNs were recovered from mice that had been injected with dying (but not live) tumor cells through footpad, the restimulation of LN-resident cells using anti-CD3ε plus IL-23 readily enhanced IL-17 production (unpublished data), a feature common to memory T cells (van Beelen et al., 2007), innate NKT (Rachitskaya et al., 2008), and γδ T cells (Sutton et al., 2009). Fourthly, the subset of NKT cells capable of producing IL-17 in LNs (CD103$^+$CD4$^-$NK1.1$^-$CCR6$^+$CD1d tetramer$^+$; Doisne et al., 2009) did not appear to be specifically triggered by dying cells in vivo (unpublished data). Moreover, CD1d$^{-/-}$ mice, which lack NKT cells, were indistinguishable from WT mice when the efficacy of chemotherapy was assessed in prophylactic vaccination settings. Fifthly, knockout of Vγ4/6 or TCR δ attenuated the protective antitumor vaccination with dying tumor cells and reduced the efficacy of the anthracycline-based chemotherapy on established tumors. Finally, the adoptive transfer of WT γδ T cells into IL-17A$^{-/-}$ hosts could restore the clinical response to chemotherapy and improve

IL-23R neutralizing antibodies, or 10 µg/ml IL-18BP. Experiments in C and D were repeated three to six times. (E and G) Tumor size was monitored in WT (circles), IL-1R1$^{-/-}$ (diamonds), and IL-23p19$^{-/-}$ (squares) mice treated with PBS (filled symbols) or DX (open symbols; E and F), or in WT mice treated with systemic anti–IL-23 neutralizing antibodies (squares) or Clg (circles; G). Data are representative of 2 experiments with 6–10 mice/group. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

Downloaded from jem.rupress.org on May 8, 2012

Published March 7, 2011

JEM

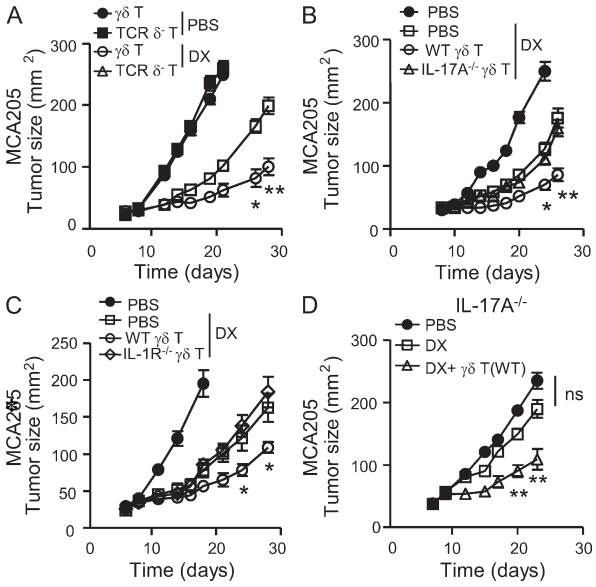


Figure 7. Role of γδ T cell–derived IL-17A during chemotherapy. $CD3^+$ TCR δ^+ or $CD3^+$ TCR δ^- T cells from WT mice (A), $CD3^+$ TCR δ^+ T cells from IL-$17A^{-/-}$ (B), or IL-$1R1^{-/-}$ (C) mice were injected intratumorally into MCA205-bearing WT mice (A–C) or IL-$17A^{-/-}$ mice (D) 2 d after PBS or DX treatment. Tumor sizes are plotted as mean ± SEM for five mice/group. Experiments were repeated two to three times with similar results. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

the response in WT hosts, and this latter effect was lost when γδ T cells from IL-$17A^{-/-}$ (rather than WT) donors were used.

In the context of immunogenic chemotherapy, it appears clear that IL-1β plays a major role in stimulating IL-17 production and the anticancer function of γδ T cells. The key role of IL-1β in regulating γδ T cells function was shown by using IL-1RA in co-cultures of DCs/γδ T cells in the presence of dying tumor cells. Also, γδ T cells that lack IL-1R1 lose the capacity to amplify the tumoricidal action of anthracyclines. Interestingly, inflammasome-dependent IL-1β secretion from DCs was also found to be mandatory for the polarization of $CD8^+$ T cells toward a Tc1 pattern (Ghiringhelli et al., 2009), suggesting that a connection between DCs, γδ T17 cells, and Tc1 cells might be important for optimal anticancer immune responses. We noticed a strong correlation between γδ T17 and Tc1 cells after chemotherapy in three different tumor models. We also noticed that the production of IL-17 production preceded that of IFN-γ by TILs. It is well possible that besides helping the development of Tc1 response, γδ T17 cells might enhance the chemoattraction of effector Tc1 into the tumor beds. These results are compatible with observations obtained in a cancer-unrelated context, microbial infection, in which γδ T17 associated with Th1 responses exert protective immune response (Umemura et al., 2007). As IL-17 could not directly induce IFN-γ production or enhance proliferation of $CD8^+$ T cells (unpublished data), our results imply a causal relationship between the presence of γδ T17 cells and the recruitment of antitumor effector Tc1 cells into tumor beds.

γδ T cells represent a major source of IL-17 during lung infection by *Mycobacterium tuberculosis* (Lockhart et al., 2006; Umemura et al., 2007) and liver infection by *Lysteria* (Hamada et al., 2008). γδ T cell-derived IL-17 is critical for the recruitment of neutrophil recruitment into the peritoneal cavity after *Escherichia coli* inoculation (Shibata et al., 2007). γδ T cells can be directly stimulated through TLR2, TLR1, and/or dectin-1 in response to *Mycobacterium tuberculosis* and *Candida albicans* to produce IL-17 in synergy with IL-23 (Martin et al., 2009). As to the mechanisms that link chemotherapy-elicited tumor cell death to the accumulation of γδ T17 cells, our data suggest that IL-1β acts as a major trigger. One previous report demonstrated the pivotal function of IL-1β in regulating γδ T17 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE; Sutton et al., 2009). In that model, IL-1β synergized with IL-23 to promote IL-17 production by γδ T, which in turn, stimulated the differentiation of pathogenic Th17 cells.

Our data can be interpreted to support the contention that the context and immune orchestration at the site of cell death may be critical for an optimal contribution of the immune system to the efficacy of anticancer therapies. The present data introduces the idea that γδ T17 cells are part of the innate immune response that facilitates the subsequent cognate anticancer T cell responses. It remains a formidable challenge for investigating further how the innate and cognate immune effectors develop a dialog within the three-dimensional architecture of the tumor composed of dying and live tumor cells, as well as multiple stromal elements. Should γδ T17 cells also be recruited into human tumor beds after chemotherapy, it would be of the utmost importance to determine their TCR Vδ usage to propose combination therapy of phosphoantigens (for $V\delta2^+$) or other ligands or innate cytokines (for $V\delta2^-$) and anthracyclines to increase therapeutic benefit in neoadjuvant settings or prevent metastases.

MATERIALS AND METHODS

Mice. WT C57BL1/6 (H-2^b) and BALB/c (H-2^d) mice aged between 7 and 12 wk were purchased from Harlan. Nude mice were bred in the animal facility of Institut Gustave Roussy. TCR $\delta^{-/-}$, IL-$1R1^{-/-}$, and IL-$17RA^{-/-}$ (H-2^b) mice were bred at Cryopréservation, Distribution, Typage, et Archivage Animal (Orléans, France) by B. Ryffel (CNRS, Orleans, France) and P. Pereira (Institut Pasteur, Paris, France; TCR $\delta^{-/-}$ was bred in the same manner). IL-$23p19^{-/-}$ and IL-$17A^{-/-}$ (H-2^b) were provided by M.J. Smyth (Peter MacCallum Cancer Centre, Victoria, Australia). $V\gamma4\gamma6^{-/-}$ mice (H-2^b) were provided by G. Matsuzaki (University of the Ryukyus, Okinawa, Japan) and K. Ikuta (Kyoto University, Kyoto, Japan). $CD1d^{-/-}$ and $CCR6^{-/-}$ (H-2^b) mice were bred at St. Vincent de Paul Hospital AP-HP (Paris, France) and provided by K. Benlagha. The experimental protocols were approved by the Animal Care and Use Committee in the animal facility of Institut Gustave Roussy.

Cell lines and reagents. CT26 (H-2^d) colon cancer, MCA205 (H-2^b) and MCA2 (H-2^d) sarcoma, TS/A mammalian cancer (H-2^d), and EG7 thymoma (H-2^b) were cultured in RPMI 1640 containing 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 100 IU/ml penicillin/streptomycin, 1 mM sodium pyruvate, and 10 mM

Downloaded from jem.rupress.org on May 8, 2012

Published March 7, 2011

Hepes at 37°C, 5% CO_2. All media were purchased from Invitrogen. Recombinant mouse IL-1β, IL-23, IL-6, TGF-β, and IL-18 BPd/Fc were purchased from R&D Systems. AhR antagonist CH223191 was obtained from EMD. DX hydrochloride (D1515), MTX dihydrochloride (M6545), and $DiOC_6(3)$ were obtained from Sigma-Aldrich. Mouse IL-17A, IL-1β, and IL-23p19 ELISA kits were purchased from eBioscience. Mouse ELISA kits and neutralizing antibody for IL-22 (AF582; AB108C as isotype control) were purchased from R&D system. Antibodies for CD45.2 (104), CD3ε (145-2C11), CD4 (GK1.5), CD8α (53–6.7), TCR δ (GL-3), CD69 (H1.2F3), IL-17A (TC11-18H10), or IFN-γ (XMG1.2) were purchased from BD or eBioscience. Anti-SCART2 polyclonal serum was provided by J. Kisielow (Swiss Federal Institute of Technology, Zurich, Switzerland). Neutralizing antibodies for IL-17A (MAB421), IFN-γ (XMG1.2), CCL20 (MAB760), IL-23 (AF1619), IL-23R (MAB1686), IL-6 (MAB406), and IL-22 (AF582) were purchased from R&D Systems. CpG oligodeoxynucleotide 1668 was obtained from MWG Biotech AG. Anti–TGF-β peptide P17 and control peptide were obtained from J.J. Lasarte (University of Navarra, Pamplona, Spain; Dotor et al., 2007),

Tumor models and chemo/radiotherapy. 8×10^5 MCA205, EG7, CT26, TS/A, or MCA2 tumor cells were inoculated s.c. near the thigh into syngeneic mice. Chemotherapy was performed in MCA205 and CT26 models by intratumoral injection of DX (2 mM, 50 µl) or OX (5 mg/kg body weight, i.p) when tumors reached 25-45 mm^2. Radiotherapy was performed by local x-ray irradiation (10 Gy; RT250; Phillips) at the unshielded tumor area when TS/A tumor reached 40–60 mm^2.

Gene expression assays. Whole RNA was extracted using RNEasy Mini kit (QIAGEN) from tumor homogenates. 5 µg of RNA from each sample were reverse-transcribed using QuantiTect Reverse Transcription kit (QIAGEN). Gene expression assays were performed with custom TaqMan Low Density Arrays using StepOnePlus Real-Time PCR System. PPIA was chosen as the endogenous control to perform normalization between different samples.

Tumor dissection and FACS analysis. Tumor burdens were carefully removed, cut into small pieces, and digested in 400 U/ml Collagenase IV and 150 U/ml DNase I for 30 min at 37°C. Single-cell suspension was obtained by grinding the digested tissue and filtering through a 70-µM cell strainer. Cells were blocked with 10 µg/ml anti-CD16/CD32 (eBioscience) before surface staining (2.5 µg/ml of each antibody). LIVE/DEAD Fixable Dead Cell Stain kit (Invitrogen) was used to distinguish live and dead cells. For intracellular staining, freshly isolated cells were treated with 50 ng/ml PMA, 1 µg/ml ionomycin, and GolgiStop (BD) for 4 h at 37°C in RPMI containing 2% mouse serum (Janvier). Cells were then stained with anti–IFN-γ and anti–IL-17 using a Cytofix/Cytoperm kit (BD).

Protein extraction. Tumors were mechanically dissociated with lysis buffer (T-PER Tissue Protein Extraction Reagent; Thermo Fisher Scientific) containing protease inhibitor (complete Mini EDTA-free; Roche). Tumor lysate was then centrifuged at 10000 *g* for 5 min at 4°C to obtain supernatant.

Purification and adoptive transfer of γδ T cells. The skin-draining LNs (inguinal, popliteal, superficial cervical, axillary, and brachial LNs) were harvested from naive mice (8–12 wk). Dead cells were removed from single-cell suspension (Dead Cell Removal kit) before γδ T cell purification (TCRγ/δ^+ T Cell Isolation kit) using AutoMACS Separator (Miltenyi Biotec) with recommended programs. Purity of this isolation normally reached >95%. The TCR δ^- $CD3^+$ cell fraction was also collected and used as control for some experiments. Day 2 after chemotherapy, 2.5×10^5 cells were injected directly into the tumor with insulin syringes for the adoptive transfer setting.

T cell priming and tumor vaccination. EG7 cells pretreated with 5 µg/ml OX overnight or left untreated were washed thoroughly and injected at 1 million/50 µl into the foodpad of naive syngeneic mice. CpG/OVA (5 µg CpG+1 mg OVA/mouse) and PBS injection were used as positive and negative controls. In some setting, neutralizing antibody (200 µg/mouse) for IL-17A or CIg was injected i.p. 5 d later, the popliteal LN cells were harvested, seeded in a 96-well plate at 3×10^5/well and restimulated with 1 mg/ml OVA protein. IFN-γ secretion was measured by OptEIA Mouse IFN-γ ELISA kit (BD). MCA205 cells were treated with 2 µM MTX overnight, washed thoroughly, and injected into left flank s.c. at 3×10^5/mouse. PBS was used as control. Mice were rechallenged with 5×10^4 live MCA205 cells in the right flank 7 d later. Tumor growth was monitored every 2–3 d.

DC-tumor mixed lymphocyte cultures. DCs were propagated in Iscoves's medium (Sigma-Aldrich) with J558 supernatant (40 ng/ml GM-CSF), 10% FCS, 100 IU/ml penicillin/streptomycin, 2 mM L-glutamine, 50 µM 2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich) and used between day 8 and 12 when the proportion of CD11c/MHC class II^+ cells was >80%. In mixed co-cultures, DCs were seeded at 10^5/100 µl/well in U-bottom 96-well plates. Tumor cells were treated overnight with 25 µM DX or left untreated, washed, and used at 7.5×10^4/100 µl/well. 2×10^4/50 µl γδ T cells were added 12 h later. Supernatant was collected 36 h later.

Statistical analyses of experimental data. All results are expressed as mean ± SEM, or as ranges when appropriate. For two groups, normal distributions were compared by unpaired Student's *t* test. Non-normal samplings were compared using the Mann-Whitney test or Wilcoxon matched paired test when appropriate. The log-rank test was used for analysis of Kaplan-Meier survival curve. Statistical analyses were performed using Prism 5 software (GraphPad). P values of <0.05 were considered significant.

Online supplemental material. Fig. S1 shows the effect of AhR antagonist on the efficacy of chemotherapy (DX). Fig. S2 depicts the Vγ chain usage of tumor-infiltrating γδ T17 and γδ T cells in the LNs of naive mice. Fig. S3 shows the effect of neutralizing IL-22, CCL20, IL-6, or blocking TGF-β on the efficacy of chemotherapy or vaccine. Online supplemental material is available at http://www.jem.org/cgi/content/full/jem.20100269/DC1.

This work was supported by LIGUE labellisée (L. Zitvogel and G. Kroemer), INFLACARE FP7 EU grant, INCa, Fondation pour la Recherche Médicale ,and Fondation de France. Y. Ma was supported by the China Scholarship Council. N.F. Delahaye was supported by INCa and INFLACARE FP7. L. Apetoh was supported by the Agence Nationale pour la Recherche [ANR-10-PDOC-014-01].

The authors have no conflicting financial interests.

Submitted: 8 February 2010
Accepted: 4 February 2011

REFERENCES

Apetoh, L., F. Ghiringhelli, A. Tesniere, M. Obeid, C. Ortiz, A. Criollo, G. Mignot, M.C. Maiuri, E. Ullrich, P. Saulnier, et al. 2007. Toll-like receptor 4–dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat. Med.* 13:1050–1059. doi:10.1038/nm1622

Aujla, S.J., Y.R. Chan, M. Zheng, M. Fei, D.J. Askew, D.A. Pociask, T.A. Reinhart, F. McAllister, J. Edeal, K. Gaus, et al. 2008. IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nat. Med.* 14:275–281. doi:10.1038/nm1710

Casares, N., M.O. Pequignot, A. Tesniere, F. Ghiringhelli, S. Roux, N. Chaput, E. Schmitt, A. Hamai, S. Hervas-Stubbs, M. Obeid, et al. 2005. Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death. *J. Exp. Med.* 202:1691–1701. doi:10.1084/jem.20050915

Couzi, L., Y. Levaillant, A. Jamai, V. Pitard, R. Lassalle, K. Martin, I. Garrigue, O. Hawchar, F. Siberchicot, N. Moore, et al. 2010. Cytomegalovirus-induced gammadelta T cells associate with reduced cancer risk after kidney transplantation. *J. Am. Soc. Nephrol.* 21:181–188. doi:10.1681/ASN.2008101072

Déchanet, J., P. Merville, A. Lim, C. Retière, V. Pitard, X. Lafarge, S. Michelson, C. Méric, M.M. Hallet, P. Kourilsky, et al. 1999. Implication of gammadelta T cells in the human immune response to cytomegalovirus. *J. Clin. Invest.* 103:1437–1449. doi:10.1172/JCI5409

Dieli, F., D. Vermijlen, F. Fulfaro, N. Caccamo, S. Meraviglia, G. Cicero, A. Roberts, S. Buccheri, M. D'Asaro, N. Gebbia, et al. 2007. Targeting

Downloaded from jem.rupress.org on May 8, 2012

Published March 7, 2011

JEM

human gammadelta T cells with zoledronate and interleukin-2 for immunotherapy of hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res.* 67:7450–7457. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-0199

Do, J.S., P.J. Fink, L. Li, R. Spolski, J. Robinson, W.J. Leonard, J.J. Letterio, and B. Min. 2010. Cutting edge: spontaneous development of IL-17-producing gamma delta T cells in the thymus occurs via a TGF-beta 1-dependent mechanism. *J. Immunol.* 184:1675–1679. doi:10.4049/jimmunol.0903539

Doisne, J.M., C. Becourt, L. Amniai, N. Duarte, J.B. Le Luduec, G. Eberl, and K. Benlagha. 2009. Skin and peripheral lymph node invariant NKT cells are mainly retinoic acid receptor-related orphan receptor (gamma)t+ and respond preferentially under inflammatory conditions. *J. Immunol.* 183:2142–2149. doi:10.4049/jimmunol.0901059

Dotor, J., A.B. López-Vázquez, J.J. Lasarte, P. Sarobe, M. García-Granero, J.I. Riezu-Boj, A. Martínez, E. Feijoó, J. López-Sagaseta, J. Hermida, et al. 2007. Identification of peptide inhibitors of transforming growth factor beta 1 using a phage-displayed peptide library. *Cytokine.* 39:106–115. doi:10.1016/j.cyto.2007.06.004

Esser, C., A. Rannug, and B. Stockinger. 2009. The aryl hydrocarbon receptor in immunity. *Trends Immunol.* 30:447–454. doi:10.1016/j.it.2009.06.005

Ghiringhelli, F., L. Apetoh, A. Tesniere, L. Aymeric, Y. Ma, C. Ortiz, K. Vermaelen, T. Panaretakis, G. Mignot, E. Ullrich, et al. 2009. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors. *Nat. Med.* 15:1170–1178. doi:10.1038/nm.2028

Godder, K., P.J. Henslee-Downey, J. Mehta, B.S. Park, K.Y. Chiang, S. Abhyankar, and L.S. Lamb. 2007. Long term disease-free survival in acute leukemia patients recovering with increased gammadelta T cells after partially mismatched related donor bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 39:751–757.

Godfrey, D.I., D.G. Pellicci, O. Patel, L. Kjer-Nielsen, J. McCluskey, and J. Rossjohn. 2010. Antigen recognition by CD1d-restricted NKT T cell receptors. *Semin. Immunol.* 22:61–67.

Gonçalves-Sousa, N., J.C. Ribot, A. deBarros, D.V. Correia, I. Caramalho, and B. Silva-Santos. 2010. Inhibition of murine gammadelta lymphocyte expansion and effector function by regulatory alphabeta T cells is cell-contact-dependent and sensitive to GITR modulation. *Eur. J. Immunol.* 40:61–70.

Hamada, S., M. Umemura, T. Shiono, K. Tanaka, A. Yahagi, M.D. Begum, K. Oshiro, Y. Okamoto, H. Watanabe, K. Kawakami, et al. 2008. IL-17A produced by gammadelta T cells plays a critical role in innate immunity against *Listeria monocytogenes* infection in the liver. *J. Immunol.* 181:3456–3463.

Hayday, A.C. 2009. Gammadelta T cells and the lymphoid stress-surveillance response. *Immunity.* 31:184–196.doi:10.1016/j.immuni.2009.08.006

Heilig, J.S., and S. Tonegawa. 1986. Diversity of murine gamma genes and expression in fetal and adult T lymphocytes. *Nature.* 322:836–840. doi:10.1038/322836a0

Hinrichs, C.S., A. Kaiser, C.M. Paulos, L. Cassard, L. Sanchez-Perez, B. Heemskerk, C. Wrzesinski, Z.A. Borman, P. Muranski, and N.P. Restifo. 2009. Type 17 CD8+ T cells display enhanced antitumor immunity. *Blood.* 114:596–599. doi:10.1182/blood-2009-02-203935

Ivanov, I.I., B.S. McKenzie, L. Zhou, C.E. Tadokoro, A. Lepelley, J.J. Lafaille, D.J. Cua, and D.R. Littman. 2006. The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell.* 126:1121–1133. doi:10.1016/j.cell.2006.07.035

Jensen, K.D., X. Su, S. Shin, L. Li, S. Youssef, S. Yamasaki, L. Steinman, T. Saito, R.M. Locksley, M.M. Davis, et al. 2008. Thymic selection determines gammadelta T cell effector fate: antigen-naive cells make interleukin-17 and antigen-experienced cells make interferon gamma. *Immunity.* 29:90–100. doi:10.1016/j.immuni.2008.04.022

Kabelitz, D., D. Wesch, and W. He. 2007. Perspectives of gammadelta T cells in tumor immunology. *Cancer Res.* 67:5–8. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3069

Kim, S.H., E.C. Henry, D.K. Kim, Y.H. Kim, K.J. Shin, M.S. Han, T.G. Lee, J.K. Kang, T.A. Gasiewicz, S.H. Ryu, and P.G. Suh. 2006. Novel compound 2-methyl-2H-pyrazole-3-carboxylic acid (2-methyl-4-o-tolylazophenyl)-amide (CH-223191) prevents 2,3,7,8-TCDD-induced toxicity by antagonizing the aryl hydrocarbon receptor. *Mol. Pharmacol.* 69:1871–1878. doi:10.1124/mol.105.021832

Kisielow, J., M. Kopf, and K. Karjalainen. 2008. SCART scavenger receptors identify a novel subset of adult gammadelta T cells. *J. Immunol.* 181:1710–1716.

Kortylewski, M., H. Xin, M. Kujawski, H. Lee, Y. Liu, T. Harris, C. Drake, D. Pardoll, and H. Yu. 2009. Regulation of the IL-23 and IL-12 balance by Stat3 signaling in the tumor microenvironment. *Cancer Cell.* 15:114–123. doi:10.1016/j.ccr.2008.12.018

Kryczek, I., M. Banerjee, P. Cheng, L. Vatan, W. Szeliga, S. Wei, E. Huang, E. Finlayson, D. Simeone, T.H. Welling, et al. 2009. Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. *Blood.* 114:1141–1149. doi:10.1182/blood-2009-03-208249

Kwong, B.Y., S.J. Roberts, T. Silberzahn, R.B. Filler, J.H. Neustadter, A. Galan, S. Reddy, W.M. Lin, P.D. Ellis, C.F. Langford, et al. 2010. Molecular analysis of tumor-promoting CD8+ T cells in two-stage cutaneous chemical carcinogenesis. *J. Invest. Dermatol.* 130:1726–1736. doi:10.1038/jid.2009.362

Lafaille, J.J., A. DeCloux, M. Bonneville, Y. Takagaki, and S. Tonegawa. 1989. Junctional sequences of T cell receptor gamma delta genes: implications for gamma delta T cell lineages and for a novel intermediate of V-(D)-J joining. *Cell.* 59:859–870. doi:10.1016/0092-8674(89)90609-0

Li, L., L. Huang, A.L. Vergis, H. Ye, A. Bajwa, V. Narayan, R.M. Strieter, D.L. Rosin, and M.D. Okusa. 2010. IL-17 produced by neutrophils regulates IFN-gamma-mediated neutrophil migration in mouse kidney ischemia-reperfusion injury. *J. Clin. Invest.* 120:331–342. doi:10.1172/JCI38702

Lockhart, E., A.M. Green, and J.L. Flynn. 2006. IL-17 production is dominated by gammadelta T cells rather than CD4 T cells during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Immunol.* 177:4662–4669.

Maniati, E., R. Soper, and T. Hagemann. 2010. Up for Mischief? IL-17/Th17 in the tumour microenvironment. *Oncogene.* 29:5653–5662. doi:10.1038/onc.2010.367

Martin, B., K. Hirota, D.J. Cua, B. Stockinger, and M. Veldhoen. 2009. Interleukin-17-producing gammadelta T cells selectively expand in response to pathogen products and environmental signals. *Immunity.* 31:321–330. doi:10.1016/j.immuni.2009.06.020

Martin-Orozco, N., and C. Dong. 2009. The IL-17/IL-23 axis of inflammation in cancer: friend or foe? *Curr. Opin. Investig. Drugs.* 10:543–549.

Martin-Orozco, N., P. Muranski, Y. Chung, X.O. Yang, T. Yamazaki, S. Lu, P. Hwu, N.P. Restifo, W.W. Overwijk, and C. Dong. 2009. T helper 17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumor immunity. *Immunity.* 31:787–798. doi:10.1016/j.immuni.2009.09.014

Mills, K.H. 2008. Induction, function and regulation of IL-17-producing T cells. *Eur. J. Immunol.* 38:2636–2649. doi:10.1002/eji.200838535

Muranski, P., and N.P. Restifo. 2009. Does IL-17 promote tumor growth? *Blood.* 114:231–232. doi:10.1182/blood-2009-04-215541

Muranski, P., A. Boni, P.A. Antony, L. Cassard, K.R. Irvine, A. Kaiser, C.M. Paulos, D.C. Palmer, C.E. Touloukian, K. Ptak, et al. 2008. Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma. *Blood.* 112:362–373. doi:10.1182/blood-2007-11-120998

Ngiow, S.F., M.J. Smyth, and M.W. Teng. 2010. Does IL-17 suppress tumor growth? *Blood.* 115:2554–2555, author reply :2556–2557. doi:10.1182/blood-2009-11-254607

Nowak, A.K., B.W. Robinson, and R.A. Lake. 2002. Gemcitabine exerts a selective effect on the humoral immune response: implications for combination chemo-immunotherapy. *Cancer Res.* 62:2353–2358.

Nowak, A.K., R.A. Lake, A.L. Marzo, B. Scott, W.R. Heath, E.J. Collins, J.A. Frelinger, and B.W. Robinson. 2003. Induction of tumor cell apoptosis in vivo increases tumor antigen cross-presentation, cross-priming rather than cross-tolerizing host tumor-specific CD8 T cells. *J. Immunol.* 170:4905–4913.

O'Brien, R.L., C.L. Roark, and W.K. Born. 2009. IL-17-producing gammadelta T cells. *Eur. J. Immunol.* 39:662–666. doi:10.1002/eji.200839120

Obeid, M., A. Tesniere, F. Ghiringhelli, G.M. Fimia, L. Apetoh, J.L. Perfettini, M. Castedo, G. Mignot, T. Panaretakis, N. Casares, et al. 2007. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat. Med.* 13:54–61. doi:10.1038/nm1523

Downloaded from jem.rupress.org on May 8, 2012

Published March 7, 2011

Panaretakis, T., N. Joza, N. Modjtahedi, A. Tesniere, I. Vitale, M. Durchschlag, G.M. Fimia, O. Kepp, M. Piacentini, K.U. Froehlich, et al. 2008. The co-translocation of ERp57 and calreticulin determines the immunogenicity of cell death. *Cell Death Differ.* 15:1499–1509. doi:10.1038/cdd.2008.67

Panaretakis, T., O. Kepp, U. Brockmeier, A. Tesniere, A.C. Bjorklund, D.C. Chapman, M. Durchschlag, N. Joza, G. Pierron, P. van Endert, et al. 2009. Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death. *EMBO J.* 28:578–590. doi:10.1038/emboj.2009.1

Peng, G., H.Y. Wang, W. Peng, Y. Kiniwa, K.H. Seo, and R.F. Wang. 2007. Tumor-infiltrating gammadelta T cells suppress T and dendritic cell function via mechanisms controlled by a unique toll-like receptor signaling pathway. *Immunity*. 27:334–348. doi:10.1016/j.immuni.2007.05.020

Pereira, P., and L. Boucontet. 2004. Rates of recombination and chain pair biases greatly influence the primary gammadelta TCR repertoire in the thymus of adult mice. *J. Immunol.* 173:3261–3270.

Pichavant, M., S. Goya, E.H. Meyer, R.A. Johnston, H.Y. Kim, P. Matangkasombut, M. Zhu, Y. Iwakura, P.B. Savage, R.H. DeKruyff, et al. 2008. Ozone exposure in a mouse model induces airway hyperreactivity that requires the presence of natural killer T cells and IL-17. *J. Exp. Med.* 205:385–393. doi:10.1084/jem.20071507

Rachitskaya, A.V., A.M. Hansen, R. Horai, Z. Li, R. Villasmil, D. Luger, R.B. Nussenblatt, and R.R. Caspi. 2008. Cutting edge: NKT cells constitutively express IL-23 receptor and RORgammat and rapidly produce IL-17 upon receptor ligation in an IL-6-independent fashion. *J. Immunol.* 180:5167–5171.

Reboldi, A., C. Coisne, D. Baumjohann, F. Benvenuto, D. Bottinelli, S. Lira, A. Uccelli, A. Lanzavecchia, B. Engelhardt, and F. Sallusto. 2009. C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nat. Immunol.* 10:514–523. doi:10.1038/ni.1716

Ribot, J.C., A. deBarros, D.J. Pang, J.F. Neves, V. Peperzak, S.J. Roberts, M. Girardi, J. Borst, A.C. Hayday, D.J. Pennington, and B. Silva-Santos. 2009. CD27 is a thymic determinant of the balance between interferon-gamma- and interleukin 17-producing gammadelta T cell subsets. *Nat. Immunol.* 10:427–436. doi:10.1038/ni.1717

Shibata, K., H. Yamada, H. Hara, K. Kishihara, and Y. Yoshikai. 2007. Resident Vdelta1+ gammadelta T cells control early infiltration of neutrophils after *Escherichia coli* infection via IL-17 production. *J. Immunol.* 178:4466–4472.

Sunaga, S., K. Maki, Y. Komagata, J. Miyazaki, and K. Ikuta. 1997. Developmentally ordered V-J recombination in mouse T cell receptor gamma locus is not perturbed by targeted deletion of the Vgamma4 gene. *J. Immunol.* 158:4223–4228.

Sutton, C.E., S.J. Lalor, C.M. Sweeney, C.F. Brereton, E.C. Lavelle, and K.H. Mills. 2009. Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. *Immunity*. 31:331–341. doi:10.1016/j.immuni.2009.08.001

Umemura, M., A. Yahagi, S. Hamada, M.D. Begum, H. Watanabe, K. Kawakami, T. Suda, K. Sudo, S. Nakae, Y. Iwakura, and G. Matsuzaki. 2007. IL-17-mediated regulation of innate and acquired immune response against pulmonary Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guerin infection. *J. Immunol.* 178:3786–3796.

van Beelen, A.J., Z. Zelinkova, E.W. Taanman-Kueter, F.J. Muller, D.W. Hommes, S.A. Zaat, M.L. Kapsenberg, and E.C. de Jong. 2007. Stimulation of the intracellular bacterial sensor NOD2 programs dendritic cells to promote interleukin-17 production in human memory T cells. *Immunity*. 27:660–669. doi:10.1016/j.immuni.2007.08.013

Veldhoen, M., R.J. Hocking, C.J. Atkins, R.M. Locksley, and B. Stockinger. 2006. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*. 24:179–189. doi:10.1016/j.immuni.2006.01.001

Wang, L., T. Yi, M. Kortylewski, D.M. Pardoll, D. Zeng, and H. Yu. 2009. IL-17 can promote tumor growth through an IL-6–Stat3 signaling pathway. *J. Exp. Med.* 206:1457–1464. doi:10.1084/jem.20090207

Wilhelm, M., V. Kunzmann, S. Eckstein, P. Reimer, F. Weissinger, T. Ruediger, and H.P. Tony. 2003. Gammadelta T cells for immune therapy of patients with lymphoid malignancies. *Blood*. 102:200–206. doi:10.1182/blood-2002-12-3665

Zitvogel, L., O. Kepp, and G. Kroemer. 2010. Decoding cell death signals in inflammation and immunity. *Cell*. 140:798–804. doi:10.1016/j.cell.2010.02.015

Downloaded from jem.rupress.org on May 8, 2012

frontiers in IMMUNOLOGY

REVIEW ARTICLE
published: 24 December 2012
doi: 10.3389/fimmu.2012.00395

Natural killer cells in non-hematopoietic malignancies

Mélanie Desbois[1,2,3], Sylvie Rusakiewicz[1,2,4], Clara Locher[1,2,3,4], Laurence Zitvogel[1,2,3,4†] and Nathalie Chaput[1,2,3,4*†]

[1] *Institut de Cancérologie Gustave Roussy, Villejuif, France*
[2] *Centre d'Investigation Clinique Biothérapie 507, Institut de cancérologie Gustave Roussy, Villejuif, France*
[3] *Faculté de Médecine, Université Paris-Sud, Le Kremlin-Bicêtre, France*
[4] *Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1015, Institut de cancérologie Gustave Roussy, Villejuif, France*

Edited by:
Eric Vivier, Centre d'Immunologie de Marseille Luminy, France

Reviewed by:
Björn Önfelt, Karolinska Institutet, Sweden
Teresa Bellon, Hospital La Paz Health Research Institute, Spain

****Correspondence:***
Nathalie Chaput, Centre d'Investigation Clinique Biothérapie 507, Institut de cancérologie Gustave Roussy, 114 rue Edouard Vaillant, 94805 Villejuif Cedex, France.
e-mail: nathalie.chaput@igr.fr

† Laurence Zitvogel and Nathalie Chaput have contributed equally to this work.

Natural killer (NK) cells belong to the innate immune system and were initially described functionallywise by their spontaneous cytotoxic potential against transformed or virus-infected cells. A delicate balance between activating and inhibiting receptors regulates NK cell tolerance. A better understanding of tissue resident NK cells, of NK cell maturation stages and migration patterns has evolved allowing a thoughtful evaluation of their *modus operandi*. While evidence has been brought up for their relevance as gate keepers in some hematopoietic malignancies, the role of NK cells against progression and dissemination of solid tumors remains questionable. Hence, many studies pointed out the functional defects of the rare NK cell infiltrates found in tumor beds and the lack of efficacy of adoptively transferred NK cells in patients. However, several preclinical evidences suggest their anti-metastatic role in a variety of mouse tumor models. In the present review, we discuss NK cell functions according to their maturation stage and environmental milieu, the receptor/ligand interactions dictating tumor cell recognition and recapitulate translational studies aimed at deciphering their prognostic or predictive role against human solid malignancies.

Keywords: NK cells, maturation stage, environment, tumors, metastases

NK CELL FUNCTIONS ARE DICTATED BY THEIR STAGE OF MATURATION AND THE MICROENVIRONMENT

Natural killer (NK) cells can have distinct functions depending on their maturation stage and the microenvironment, rendering complex the physio-pathological role attributed to NK cells. The majority of mature NK cells circulate in the peripheral blood, but are also resident in several lymphoid and non-lymphoid organs, such as the spleen, tonsils, lymph nodes (LNs), liver, lungs, intestine, and uterus (Shi et al., 2011).

MOUSE NK CELLS

In mice, the phenotype of NK cells is defined among lymphocytes as $CD3^-NK1.1^+NKp46^+$. Mature NK (mNK) cells are identified by the expression of the integrin CD11b (Kim et al., 2002) and can be further subdivided into various subsets according to the differentiation marker CD27 (Hayakawa and Smyth, 2006). In adoptive transfer experiments, $CD11b^-$ immature NK (iNK) cells pass through the $CD27^+$ stage prior to reaching the terminal $CD27^-CD11b^+$ stage (Chiossone et al., 2009). $CD27^+$ NK cells harbored greater cytotoxic function, proliferation capacity, and interferon-γ (IFN-γ) secretion after stimulation with interleukin (IL)-12 and/or IL-18 than the $CD27^-$ expressing counterparts. CXCR3 is exclusively expressed by the $CD11b^+CD27^+$ NK cell subset, endowing cells with an active chemotaxis toward CXCR3 ligands (CXCL10, IP-10, CXCL11) and a preferred migration to lymphoid tissues (Hayakawa and Smyth, 2006). Hence, $CD11b^+CD27^-$ NK cells are considered terminally differentiated, long-lived cells, preferentially located in non-lymphoid tissues and exhibiting a functional restriction by self-major histocompatibility complexes (MHC; **Figure 1**).

A recent study described a premature NK cell subset (preNK; Guimont-Desrochers et al., 2012) preceding the $CD27^+$ mNK cell stage. This NK cell stage may correspond to the interferon-producing killer dendritic cells (IKDC) described in 2006 (Chan et al., 2006; Taieb et al., 2006). Indeed, Taieb et al. (2006) and others (Chan et al., 2006) described $CD11c^{int}$ $B220^+CD49b^+NK1.1^+MHC\text{-}II^+$ cells sharing both antigen presentation and cytotoxic functions culminating in anti-tumor activity (Taieb et al., 2006). Guimont-Desrochers et al. (2012) showed that mNK cells fail to acquire B220, even after *in vivo* stimulation, suggesting that $CD11c^{int}$ $B220^+$ NK cells may not merely result from NK cell activation (Vosshenrich et al., 2007). They

Abbreviations: AM, alveolar macrophages; CCL2, CC-chemokine ligand 2; CCL5, CC-chemokine ligand 5; CCR2, CC-chemokine receptor 2; CCR5, CC-chemokine receptor 5; CCR8, CC-chemokine receptor 8; CD, cluster of differentiation; CLA, cutaneous leukocyte antigen; CSF1R, colony stimulating factor 1 receptor; CX3CL1, CX3C-chemokine ligand 1; CX3CR1, CX3C-chemokine receptor 1; CXCL10, CXC-chemokine ligand 10; CXCL11, chemokine (C-X-C motif) ligand 11; CXCL12, CXC-chemokine ligand 12; CXCR3, CXC-chemokine receptor 3; CXCR6, CXC-chemokine receptor 6; DC, dendritic cell; DSC, decidual stromal cells; EVT, extravillous trophoblast; GIST, gastrointestinal stromal tumor; HCV, hepatitis C virus; HLA, human leukocyte antigen; IBD, intestinal bowel diseases; IFN-α, interferon-α; IFN-γ, interferon-γ; IFNAR1, interferon (alpha, beta, omega) receptor 1; IL, interleukin; IM, imatinib mesylate; IP-10, interferon gamma-induced protein 10; KIR, killer cell Ig-like receptor; KLRG1, killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1; MCSF, macrophage colony-stimulating factor; NCR, natural cytotoxicity receptors; NK cells, natural killer cells; PD-1, programmed cell death protein-1; PD-L1, programmed cell death 1 ligand 1; RANK, receptor activator of nuclear factor κB; RANKL, receptor activator of nuclear factor κ-B ligand; SA, spiral arteries; TRAIL, TNF-related apoptosis-inducing ligand; T_{reg}, regulatory T cell.

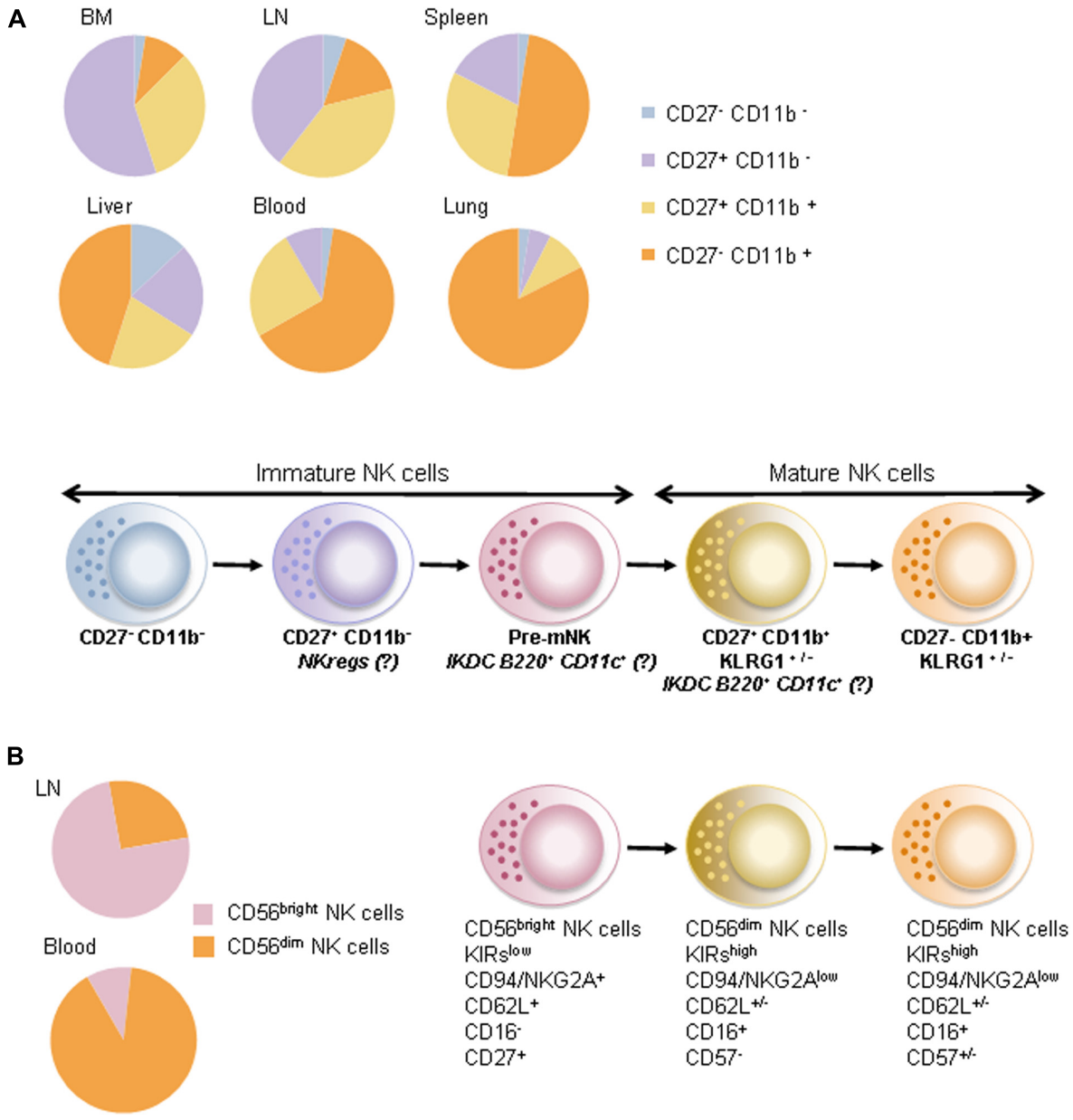


FIGURE 1 | Maturation stage of NK cells. (A) In mice, the maturation stage of CD3$^-$ NK1.1$^+$ NKp46$^+$ NK cells is defined using both CD27 and CD11b molecule expressions. Upper panel shows relative proportions of NK cells at steady state in bone marrow (BM), lymph nodes (LN), spleen, liver, blood, and lungs. Lower panel shows the differentiation of NK cells based on the expression of CD27 and CD11b. IKDCs expressing B220 and CD11c molecules would be part of a premature NK cell fraction (pre-mNK) and of a CD27-positive fraction of mature NK cells also expressing the mannose receptor (CD206). NKreg cells have an immature phenotype in that they are CD27-positive and CD11b-negative. **(B)** In humans, CD19$^-$CD3$^-$CD56$^+$ NK cells are generally defined by high expression (bright) or intermediate (dim) expression of the CD56 molecule. As in mice, these two populations (CD56^{bright} and CD56^{dim}) are enriched in separate compartments: CD56^{bright} NK cells predominate in lymph nodes while CD56^{dim} NK cells predominate in peripheral blood. Various studies suggested that NK cells expressing CD56^{dim} would be more terminally differentiated compared to NK cells expressing CD56^{bright}.

showed that, by 5 days post-transfer, CD11c^{int} B220$^+$CD49b$^+$ NK cells down-regulated CD11c, B220, and CD27, and acquired CD43, in agreement with functional maturation. By 25 days post-transfer, all B220$^+$ NK cells had completely lost B220 expression and exhibited a CD11c$^{neg/low}$ CD11b$^+$CD27$^-$ phenotype compatible with terminally differentiated NK cells. These pre-mNK cells were actively cycling, a characteristic associated with precursor cell populations (Guimont-Desrochers et al., 2012). Thus, CD27$^+$ CD11b^{low} CD49b$^+$ CD11c^{int} B220$^+$ NK cells could be defined as pre-mNK cells, an immediate precursor to CD27$^+$ CD11b$^+$ NK cells. Moreover, our data pointed out that half of IKDCs were CD11b$^+$. Such CD11b$^+$CD27$^+$IKDCs expressed

the mannose receptor (CD206) accounting for ovalbumin (OVA) protein uptake and OVA-specific $CD8^+$ T cell priming *in vivo*. Thus, we reported that the mature fraction of IKDCs could exert antigen-presentation capacity (Terme et al., 2009).

Interestingly, among the iNK cells (defined as $CD11b^-CD27^+$), we recently identified a distinct subset endowed with regulatory functions (that we named "NKreg"). NK cells defined as $CD27^+$ $CD11b^{low}$ c-Kit^+ $NKp46^+$ NK cells expressed molecules associated with immunosuppressive functions (such as CTLA4, Lag-3, and PDL-1). These Kit^+ NK cells accumulated in primary and secondary lymphoid organs of tumor bearers in an IL-18-dependent fashion. Blockade of tumor-derived IL-18 markedly prevented NKreg accumulation and melanoma dissemination. Kit^+ NK cells operated their immunosuppressive effect by directly killing immature dendritic cells (DC) and indirectly reducing the pool of peripheral mNK cells. Anti-PD1 or anti-PDL-1 neutralizing antibodies counteracted all these immunosuppressive effects. Hence, the adoptive transfer of NKreg cells promoted tumor outgrowth and metastases spreading (Terme et al., 2012). Our study is in accordance with others describing iNK cells with regulatory functions. In a mouse model of leukemia, $CD49b^+$ $CD90^{bright}$ c-Kit^{dim} NK cells expanded; compromised DC maturation and could blunt allogeneic T cell proliferation (Ebata et al., 2006). Hence, these data indicate that distinct subsets of "imNK" could exert intrinsic inhibitory functions. In addition, mNK may secrete suppressive cytokines and exert regulatory functions in pathology such as infections, autoimmunity, and transplantation. Perona-Wright et al. (2009) showed that NK cells could secrete IL-10 during the acute phase of systemic infections. NK cell-derived IL-10 hampered the expression of MHC and co-stimulatory molecules and suppressed the production of pro-inflammatory cytokines by DC (Perona-Wright et al., 2009). In autoimmune disease, NK3-like cells secreting transforming growth factor beta (TGF-β) could protect mice against type I diabetes (Zhou et al., 2007). NK cells promoted allograft tolerance (Beilke et al., 2005) and reduced graft versus host disease (GVHD) by limiting allogeneic T cell proliferation (Noval Rivas et al., 2010), presumably through eradication of myeloid DC.

Finally, NK cells from extra-medullary tissues harboring tissue-specific phenotypes suggest that the maturation can be completed in organ different from bone marrow including thymus, liver, uterus, and gut. Thymic NK cells have several peculiarities compared with "conventional" NK cells: (i) they express high levels of IL-7Rα chain (CD127) and the transcription factor GATA-3, (ii) they produce cytokines but display low natural cytotoxicity, (iii) they accumulate in LNs (Vosshenrich et al., 2006). Uterine NK cells promote vascular remodeling and influence the recruitment and activation of other leukocytes to regulate the physiology of pregnancy (Santoni et al., 2007). In the liver, bone marrow-derived NK cells migrate into the liver where they differentiate into liver-specific NK cells (Vanderkerken et al., 1993). Hepatic NK cells display potent cytotoxic capacity expressing high levels of TRAIL, granzyme B, and perforin molecules (Ochi et al., 2004; Takeda et al., 2005). A recent study has shown that $CD11c^+$ NK cells could play a major role during adenoviral hepatitis (Burt et al., 2008), these $CD11c^+$ NK cells gained a modest antigen-presenting cell capacity thus functionally resembling to NKDCs (Pillarisetty et al., 2005; Plitas et al., 2007) or IKDCs (Taieb et al., 2006). Finally, CXCL16 (the ligand for CXCR6) is constitutively secreted by the liver sinusoidal endothelium leading to the accumulation of $CXCR6^+$ NK cells that represent a consistent fraction of liver NK cells. $CXCR6^+$ NK cells are drastically reduced in CXCR6 knockout mice. CXCR6-expressing NK cell has been suggested to develop an adaptive-like immunity, memory NK cell development depend on CXCR6 expression by NK cells a chemokine receptor required for the maintenance of these memory NK cells (Paust et al., 2010). In the mouse intestine, two subsets of $NKp46^+$ cells are present in the gut (Satoh-Takayama et al., 2008). Conventional NK cells secrete IFN-γ and lack expression of RORγt, whereas $ROR\gamma t^+$ $NKp46^+$ cells secrete IL-22 (also called "NK22") following stimulation with IL-23 and do not require IL-15 for their differentiation (Luci et al., 2009). IL-15-dependent $NKp46^+$ NK cells represent the major source of CCL3 during -induced ileitis leading to the recruitment of $CCR1^+$ inflammatory monocytes (Schulthess et al., 2012). However, IL-18 (and not IL-15) favored CCL3 secretion by these intestinal and pathogenic NK cells (Schulthess et al., 2012). The authors discussed the possibility that such pathogenic NK cells could cause the recruitment of inflammatory monocytes in Crohn's disease (Schulthess et al., 2012). However, it is of note that the precise lineage of gut mucosa associated-$NKp46^+$ cells remains debated and it is still unclear if they are developmentally related to the NK cells and/or to the lymphoid tissue inducer cells or if they represent a distinct innate immunity cell types (Colonna, 2009; Spits and Di Santo, 2011).

HUMAN NK CELLS

In humans, the blood NK cell pool ($CD19^-CD3^-CD56^+$ among lymphocytes) is commonly divided into two distinct subsets, based on the surface intensity of CD56 expression and the low-affinity Fc receptor CD16. A major population of $CD56^{dim}$ NK cells (roughly 90%) expresses high levels of CD16, whereas a minor subset of $CD56^{bright}$ NK cells fails to express CD16 (Lanier et al., 1986). Moreover, $CD56^{dim}$ NK cells exert high levels of killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR) and low levels of CD94/NKG2 receptors in contrast to $CD56^{bright}$ NK cells (**Figure 1**). These two populations were shown to differ functionally in that $CD16^{low}$ $CD56^{bright}$ are considered more potent cytokine producers while $CD16^{high}$ $CD56^{dim}$ NK cells display higher cytotoxic functions. Only $CD56^{dim}$ cells mediate CD16-dependent antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC; Cooper et al., 2001). However, although $CD56^{bright}$ NK cells can produce high amounts of cytokine after 24 h stimulation with IL-12 or IL-18, $CD56^{dim}$ cells also produce high quantities of cytokine after engagement of the activating receptors or after short-term cytokine stimulation (Fauriat et al., 2010; De Maria et al., 2011). This notion suggests that extrinsic factors (dictated by microenvironmental cues or soluble factors) may shape NK cell functions regardless of their "so called maturation stage." Hence, $CD56^{dim}$ and $CD56^{bright}$ NK cells differ in their *in vivo* localization. $CD56^{bright}$ NK cells express chemokine receptors (such as CCR7, CXCR3, and CD62L) favoring a preferential migration into lymphoid organs (LN) and a privileged interaction with LN-residing antigen-presenting cells (Campbell et al., 2001; Cooper et al., 2001). In contrast, $CD56^{dim}$ NK cells are enriched in tonsils,

lungs, mucosal sites, and the uterus (Ferlazzo et al., 2004). As a corollary to the murine data, CD27 has been shown to be expressed by the $CD56^{bright}$ fraction of human NK cells and by LN resident NK cells in humans (Silva et al., 2008; Vossen et al., 2008). Analogous to the relationship between $CD27^+$ and $CD27^-$ mNK cells in mice, $CD27^+CD56^{bright}$ NK cells are considered as the immature subset of human circulating NK cells (Silva et al., 2008; Vossen et al., 2008).

Apart from blood and lymphoid tissues, organ-specific distribution and function of NK cells has been described. NK cells are present in normal liver and aid to control tolerance and homeostasis (Doherty and O'Farrelly, 2000), a dialog between Kupffer cells and NK cells allowing the tuning of hepatic NK cells during infection or liver injury (Tu et al., 2008). Half of hepatic NK cells are $CD56^{bright}$ $CD16^{low}$, express CCR7 and CXCR3, the inhibitory molecule NKG2A and high levels of TRAIL. Liver TRAIL-expressing NK cells contribute to hepatocellular damage and clearance of hepatitis C virus (Dunn et al., 2007; Stegmann et al., 2010). In the uterus (Whitelaw and Croy, 1996), *in situ* development of NK cells from precursors is induced by IL-15 and stem cell factor (SCF). NK cells can also be recruited by extravillous trophoblast (EVT) via CXCL12 secretion. Activated NK cells secrete IFN-γ that participate in the remodeling of spiral arteries. Decidual stromal cells secrete TGF-β that results in the down-regulation of CD16 expression, thus decreasing the ADCC of NK cells. Expression of HLA-C2 haplotype on EVT predisposes for preeclampsia (Hiby et al., 2004; Parham, 2004). In the mucosa surrounding the lymphoid follicles of tonsils and Peyer's patches of the ileum/appendix, innate cells referred to as NK22 express the activating receptor NKp44 as well as the chemokine receptor CCR6 and may promote mucosal homeostasis (Cella et al., 2009). The expression of CC-chemokine receptor 8 (CCR8) and cutaneous leukocyte antigen (CLA) is restricted to human skin-resident NK cells. Skin NK cells are mostly $CD56^+/CD16^{low}$ and display strong cytotoxic activity against melanoma cells (Ebert et al., 2006).

Collectively, these data support the theory that the maturation stage of NK cells and environmental factors may cooperate to shape their functional activities, as already described for other innate cells such as DC. Although, in steady-state conditions, mNK cells can be found in some lymphoid and non-lymphoid organs, following an insult such as a infection, inflammation, or cancer, specialized NK cell subsets can be rapidly recruited to injured organs to perform their specific function (elimination of danger) and/or re-establish tissue integrity.

NK CELLS ARE ABLE TO RECOGNIZE TUMOR CELLS

Tumor cells expose several ligands that can be recognized by NK cells rendering tumor susceptible to NK cell attack. Interestingly, accumulating evidences showed that NK cell-mediated elimination of tumor cells will lead to the subsequent development of tumor-specific T cell responses against the parental tumor cells (Diefenbach et al., 2001; Kelly et al., 2002).

MOLECULES IMPLICATED IN THE RECOGNITION OF TUMORS BY NK CELLS

For more than 20 years, several lines of evidence demonstrated the important role of NK cells in the control of solid malignancies. The pioneering demonstration was conducted in the beige mouse in 1980 (Talmadge et al., 1980). Beige mice mimics human Chediak–Higashi syndrome presenting with defective natural cytotoxicity against tumor cells. Using a NK cell sensitive (but not resistant) tumor cell line, Talmadge et al. reported increased growth rate, faster induction time and increased metastatic dissemination of tumors established in beige compared to control mice. Later, depletion experiments using anti-asialoGM-1 or anti-NK1.1 antibodies concluded to the crucial role of mouse NK cells in keeping in check tumor growth and metastatic spread (Gorelik et al., 1982; Aboud et al., 1993; Smyth et al., 2001). Conversely, adoptive NK cell transfer could restore resistance to metastatic spreading, establishing a causal link between NK cells and tumor control in wild-type mice (Gorelik et al., 1982; Aboud et al., 1993; Smyth et al., 2000, 2001; Street et al., 2001). Moreover, a prominent role for Ly49 receptors (Ljunggren and Karre, 1985; Karre et al., 1986; Glas et al., 1992, 2000; Koh et al., 2001), NK group 2 member D (NKG2D) activating receptors (Diefenbach et al., 2001), DNAX accessory molecule-1 (DNAM-1; Lakshmikanth et al., 2009), and components of the NK cell secretory and cytotoxic machinery (Street et al., 2001; Takeda et al., 2011), TRAIL (Taieb et al., 2006) was reported in the control of tumor growth and metastases in mice.

In addition, translational research in patients argues on the role of NK cells in immunosurveillance against cancer (Imai et al., 2000; Guerra et al., 2008; Kreisel et al., 2012). The KIR (Moretta et al., 1996) and CD94/NKG2A heterodimers (Braud et al., 1998) participate in the regulation of NK cell activation by tumor cells. Indeed, tumor cells can down-regulate MHC class I expression the missing self-engagement of NK cell activation favoring tumor elimination (Vivier et al., 2012). Next to this mechanism, stress-induced molecules also activate NK cells. NKG2D plays an important role in the recognition of stress-induced molecules such as the polymorphic MHC class I chain-related molecules (MIC)A and MICB human (Groh et al., 1996; Bauer et al., 1999) and the cytomegalovirus UL-16 protein (ULBP; Cosman et al., 2001). Such proteins are frequently expressed in primary carcinomas (Pende et al., 2002; Vetter et al., 2002; Friese et al., 2003; Watson et al., 2006). The identification of two NKG2D haplotypes associated with differential NK cytotoxic potential and risk of cancer illustrates the importance of NKG2D in the anti-tumor immunosurveillance (Hayashi et al., 2006). Natural cytotoxicity receptors (NCR) are also implicated in the destruction of tumor cells. All three NCRs are implicated in the clearance of a variety of tumors, including carcinomas, melanomas, and neuroblastomas. Among self-ligands expressed by tumor cells and able to activate NK cells, heparan sulfate moieties of heparin sulfate proteoglycans have been described as self-modified ligands for NCRs (Jayson et al., 1998; Blackhall et al., 2001), these ligands being rarely expressed on normal cells (Bloushtain et al., 2004; Hershkovitz et al., 2007, 2008; Cagnano et al., 2008; Hecht et al., 2009; Jarahian et al., 2011). NKp30, NKp44, and NKp46 recognize highly sulfated heparan sulfate/heparin-type structures (Hecht et al., 2009). B7 homolog 6 (B7-H6), absent from normal cells but expressed on the K562 cell line and other acute myeloid leukemia and solid tumors, was identified as a ligand for NKp30. Moreover, nuclear factors (up-regulated or disturbed in their distribution) represent

alternate ligands for NCRs. Hence, HLA-B-associated transcript 3 (BAT3) was identified as a ligand for NKp30 activating NK cells. BAT3 can be either re-localized at the cell surface or expressed on tumor-derived exosomes shed in the extracellular milieu (Pogge von Strandmann et al., 2007; Simhadri et al., 2008). Finally, proliferating cell nuclear antigen (PCNA) which is highly expressed in proliferating cells and associated with malignancy (Stoimenov and Helleday, 2009) was shown to be recruited in the immunological synapse formed between NK and tumor cells, leading to inhibitory triggering of NKp44 receptors (Rosental et al., 2011).

NK CELLS CONSTRAIN METASTATIC DISSEMINATION

Several cell autonomous features resulting in NK cell recruitment and/or activation have been described. Hence, the interferon regulatory factor irf7 is a key molecule limiting bone metastases in a NK and $CD8^+$ T cell-dependent manner (Bidwell et al., 2012). Enforcing irf7 expression by tumor cells could restore type I IFN signaling, leading to inhibition of metastatic dissemination in the 4T1.2 breast cancer bone metastasis model (Lelekakis et al., 1999; Eckhardt et al., 2005). Differences in gene expression profiles of tumor cells isolated from matched pairs of primary tumors and bone metastases revealed that a high number of IFN-related genes were down-regulated in bone metastases including irf7 (Bidwell et al., 2012). 4T1.2 clones overexpressing IRF7 were able to produce significant levels of IFN-α compared to the 4T1.2 control cell line. 4T1.2-irf7$^+$ presented with reduced dissemination to the bones in an IFNAR1-dependent manner. Depletion of $CD4^+$, $CD8^+$, and NK cells demonstrated that $CD8^+$ and NK cells (but not $CD4^+$ T cells) were needed for the irf7-dependent anti-metastatic effect (Bidwell et al., 2012). Treatment with 10^5 IU of recombinant IFN-α could reduce bone metastases in mice bearing the 4T1.2 tumors, causing the up-regulation of irf7, irf9, and STAT1 in the wild-type 4T1.2 cell line. Finally, authors showed that defective irf7 signaling pathway in human breast cancers was significantly associated with bone metastases as the first site of dissemination (Bidwell et al., 2012). Moreover, irf1 expression by the tumor was mandatory for NK cell-dependent suppression of metastases (Ksienzyk et al., 2011). Here, irf1 was implicated in the suppression of lung metastases, but not tumor spreading to the bone (Bidwell et al., 2012). Both type I and II IFNs were dispensable for the NK cell-mediated resistance to lung metastases. Irf1 expression by tumor cells was associated with an increased CXCL11/CXCR3-dependent NK cell infiltration of lung nodules. Moreover, irf1 could induce tumor cell surface expression of MHC class I molecules, death receptor DR5 and adhesion molecule CD155 (ligand for DNAM-1). Hence, NK cell-mediated elimination of lung metastases was mainly dependent on DNAM-1 receptors and only partially on TRAIL molecules (Ksienzyk et al., 2011). Altogether, these lines of evidence indicate the cell intrinsic role of interferon-related pathways in the control of metastatic dissemination by NK cells. Moreover, various subsets of NK cells appear to control bone (Bidwell et al., 2012) or lung (Ksienzyk et al., 2011) dissemination. Indeed, while $CD27^+$ NK cells prevailed against bone marrow metastases (Bidwell et al., 2012), terminally differentiated NK cells seem to control lung metastases (Sceneay et al., 2012). Indeed, over 80% of lung NK cells are mature $CD11b^+$ cells.

In contrast, other reports point to a role for myeloid cells in suppressing the function of mNK in metastatic niches. Sceneay et al. (2012) reported that hypoxia at the primary tumor site led to enhanced secretion of soluble factors that favor metastatic dissemination. Particularly, under hypoxic conditions, soluble factors secreted by the primary tumor induce the recruitment of bone marrow-derived cells in the lungs. Hypoxia caused the accumulation of granulocytic $CD11b^+/Ly6C^{med}/Ly6G^+$ myeloid cells through a monocyte chemoattractant protein 1 (MCP1)-dependent mechanism as well as that of iNK cells ($CD11b^-/CD27^-$) endowed with poor anti-tumor effector functions. Authors assume that $CD11b^+/Ly6C^{med}/Ly6G^+$ myeloid cells could inhibit NK cell differentiation, as myeloid cell accumulation has been inversely correlated with suppression of NK cell function in murine tumor models (Liu et al., 2007; Mauti et al., 2011). In methylcholanthrene-induced carcinogenesis as well as transplantable metastases models, NLRP3 inflammasome was shown to support metastases formation. Expansion of $CD11b^+$ $Gr1^{int}$ myeloid cells within the lung tumor microenvironment of NLRP3 knockout mice was concomitant with increased lung infiltrating activated NK cells and an improved anti-metastatic response. These myeloid cells secreted CCL5 and CXCL9 chemokines favoring the trafficking of NK cells into metastatic lungs (Chow et al., 2012).

Considering that NK cells can regulate metastatic dissemination, it remains unclear whether NK cells are able to modify the metastatic potential of primary tumor cells and premetastatic niche and/or could represent an efficient innate barrier that could prevent tumor cell implantation. To our knowledge, scarce data exist demonstrating that NK cells could modify tumor cells in the primary tumor in a way that would decrease metastatic potential. Some data suggested that NK cells could have cytotoxic activity against cancer stem cells, which represent a more chemo- and radio-resistant subpopulation within cancer (Tseng et al., 2010; Jewett and Tseng, 2011; Jewett et al., 2012). Considering accumulating evidence incriminating tumor stemness as a risk factor for metastatic relapse (van Zijl et al., 2009; Raimondi et al., 2010; Yu et al., 2012), high NK cell infiltration in the primary tumor could be a good biomarker associated with low risk of metastatic relapse. Recently, the epithelial-mesenchymal transition (EMT) process was linked to the gain of stem cell competence (Mani et al., 2008; Polyak and Weinberg, 2009). Thus, EMT favors the generation of tumor cells with self-renewing properties and high proliferative capacity, enhancing their chances to seed at a distant site and to grow metastases. Factors that can influence EMT and/or stemness such as hypoxia and TGF-β (Das et al., 2008; Heddleston et al., 2009) are also known to inhibit NK cell functions. Thus, it is conceivable that agents reinvigorating NK cells in the tumor bed could decrease its metastatic potential and thus reduce time to relapse.

In humans, NK cell infiltration (determined with different NK cell markers, i.e., CD57, CD56, NKp46, CD3, and CD56) is often studied on a tumor burden after curative resection. Interestingly, NK cell infiltrates are often associated with a lower risk of relapse and/or longer survival (**Table 1**). However, in most cases, NK cell numbers are limited compared with other effectors as reported using tissue microarrays of melanomas (Erdag et al., 2012; Sconocchia et al., 2012), hepatocellular carcinomas

Table 1 | Tumor infiltrating NK cells in human cancers.

Cancer	Stage	Sample size	Method	Markers used for NK cells analysis in IHC studies	Results	Reference
CRC	II–III	93	IHC	CD56, CD57	Low tumor stage ($P = 0.004$), marked $CD8^+$ ($P = 0.04$, see Figure 2) and $CD57^+$ ($P = 0.05$, see Figure 3) cell infiltration in the advancing tumor margin were correlated with a longer disease-free survival in multivariate analysis	Menon et al. (2004)
CRC	II–III	88	IHC	CD56	NK cells are rare compare to $CD8^+$ cells (7/mm^2 versus 76/mm^2). Surprisingly in tumor with low expression of HLA class I higher $CD8^+$, but not $CD4^+$ cell infiltration was observed	Sandel et al. (2005)
CRC	IV	68	IHC	CD56	Thirty-three patients were treated with adjuvant FOLFIRI regimen or FOLFOX with Cetuximab and 35 patients received adjuvant FOLFIRI regimen or FOLFOX regimen alone. In cetuximab treated patients only CD56 and K-ras mutation status were independent predictors of the best overall response and progression-free survival. $CD56^-$ tumors [HR 2.6 (95% CI: 1.14–6.00); $P = 0.019$] and K-ras mutations [HR 4.74 (95% CI: 1.8–12.3); $P = 0.001$] were significant independent negative prognostic markers for the PFS	Marechal et al. (2010)
CRC	IV	112	IHC	NKp46	Primary tumors and liver metastases were analyzed. Low NK cell number was detected in tumor and liver metastases. No correlation between NK cell infiltration and chemokine profile within the tumor tissue or relation between HLA class I expression and NK cell infiltrate were found. In this study no prognostic study was realized	Halama et al. (2011)
CRC	I–IV	1414	IHC (TMA)	CD56, CD57, CD16	This cohort included a mix of MMR deficient and proficient. CD56 cell infiltrate was observed in 38% of CRC. No prognostic role of NK cells infiltrate was determined in this cohort	Sconocchia et al. (2010)
Gastric CRC	I–IV	34 18	IHC, FCM	CD3, CD56	Patients with and without liver metastases were studied. The number of $CD3^-CD56^+$ (mostly $CD56^{dim}$ NK cells) and $CD3^+CD56^+$ cells were decreased in metastatic livers compared to those unaffected by metastases. Interestingly lower $CD56^+$ cell infiltration could be observed in patients with multiple liver metastases	Gulubova et al. (2009)
Gastric Esophageal	I–IV	50 35	IHC, FCM	CD56	NK cells inversely correlated with H_2O_2 production in the tumor microenvironment. The frequency of $CD56^{dim}$ tumor-infiltrating NK cells decreased according to disease progression	Izawa et al. (2011)
GIST	IV	8	IHC, FCM	CD56	NK cells highly infiltrate GIST tumors. An inverse correlation was observed between NK cell infiltrate and metastasis occurrence.	Delahaye et al. (2011)
GIST	I–IIIB	47	IHC	CD56	Untreated c-Kit-positive primary GISTs were analyzed. NK cells represent a small fraction of tumor-infiltrating immune cells (34 ± 41 cells/mm^2) compared to $CD3^+$ cells (201 ± 331 cells/mm^2) or monocyte-derived cells. No prognostic study was achieved	Cameron et al. (2008)
NSCLC	II–IIIA	150	IHC	CD57	In univariate analysis, $CD57^+$, defined as $CD57^{high}$, were associated with longer survival ($P < 0.0002$). CD57 cell infiltration is a prognostic factor in univariate analysis, but was not an independent prognostic factor from classical T and N classification in multivariate analysis	Takanami et al. (2001)

(Continued)

Table 1 | Continued

Cancer	Stage	Sample size	Method	Markers used for NK cells analysis in IHC studies	Results	Reference
NSCLC	I–III	335	IHC (TMA)	CD56	Multivariate analysis showed that stromal $CD56^+$ cells were an independent prognostic factor for disease-specific survival [HR 2.3 (95% CI: 1.1–5.0), $P = 0.031$]	Al-Shibli et al. (2009)
NSCLC	I–III	28	IHC (Frozen sections), FCM	NKp30, NKp46	NK cells infiltrating NSCLC are mostly $CD56^{bright}$ NK cells with impaired cytotoxic capacities against tumor cells	Carrega et al. (2008)
NSCLC	I–II	86	IHC, FCM	NKp46	NK cells are recruited and localized in the stroma of the tumor rather than in the tumor nest. NK cells exhibited an altered phenotype with down-regulated NKp30, NKp80, CD16, NKG2D, and DNAM-1 while NKp44 and CD69 were over-expressed. Functional studies showed that tumor infiltrating NK cells had impaired cytotoxic functions compared to blood NK cells. Prognostic study in this cohort showed that the presence of NK cells is not associated with clinical outcome at early stages of the disease	Platonova et al. (2011)
Squamous cell lung carcinoma	IA–IIIA	50	IHC	CD57	Multivariate analysis including surgical-pathologic stage, age and endoscopy localization, the risk of death in patients with less than five $CD57^+$ cell per field was 2.50 fold higher (95% CI: 1.07–5.85) than in those patients with more than five $CD57^+$ cell per field	Villegas et al. (2002)
Prostate	Gleason 2–10	75	IHC	CD56	Forty patients were analyzed after radical prostatectomy and 35 after androgen deprivation therapy. In androgen deprivation treated patients, high number of CD56 cells was associated with a lower risk of prostate cancer progression ($P = 0.044$), while a high density of CD68 was related to an increased risk of biochemical recurrence ($P = 0.011$)	Gannon et al. (2009)
BC	I–III	204	IHC (TMA)	CD57	CX3CL1 expression correlates with $CD8^+$ and $CD57^+$ cell infiltrations. Tumor stage (I/II versus III), HER-2 status and CX3CL1 expression were independent prognostic factors for disease-free and overall survival	Park et al. (2012)
BC	I–III	140	IHC, FCM	CD56, CD3	In tumor tissue NK cells were enriched with $CD56^{bright}$ cells with poor cytotoxic potential compared to normal mammary tissue. An inverse correlation between regulatory T cell and NK cell infiltrates was found. No prognostic study was achieved.	Mamessier et al. (2011b)
RCC	I–IV	117	IHC (TMA)	CD56, CD16	No CD56 cell infiltrates were detected in 92% of renal cell carcinomas	Sconocchia et al. (2009)
Melanoma	IIIA–IV	183	IHC (TMA)	CD56	Very low infiltration with $CD56^+$ NK cells is described. CD4, CD8, and CD20 represented 80% of the immune infiltrate in this cohort	Erdag et al. (2012)
Melanoma HCC BC	ND	284 336 385	IHC (TMA)	CD56	No CD56 cell infiltrate was detected in 71.4% of melanomas, 92% of hepatocellular carcinomas and 97% of breast carcinomas	Sconocchia et al. (2012)

CRC, colorectal cancer; NSCLC, non-small cell lung cancer; BC, breast carcinoma; GIST, gastro-intestinal stromal tumor; HCC, hepato-cellular carcinoma; RCC, renal cell carcinoma; ND, not described.

(Sconocchia et al., 2012), breast cancers (Sconocchia et al., 2012), renal cell carcinomas (Sconocchia et al., 2009), and colon rectal cancers (Sconocchia et al., 2010). Very low NK cell infiltration could be monitored in these different solid tumors, except for colorectal carcinomas where 38% of tumor samples appeared to be infiltrated by NK cells (Sconocchia et al., 2010, 2012). Furthermore, the activation status of NK cells infiltrating the tumor and/or tumor niches might play a crucial role in tumor clearance and/or prevention of tumor spreading. Many reports in cancer patients have demonstrated that NK cells have altered cytotoxic functions usually correlated with down-regulation of NCR while tumor cells usually express ligands for these NCR (Menard et al., 2009; Mamessier et al., 2011a,b; Platonova et al., 2011).

Over the past decade, we investigated the role of NK cells in the control of gastrointestinal sarcomas (GIST). Unexpected long-term responses to imatinib mesylate (IM) have been reported in GIST lacking the hallmark molecular criteria of responses to IM (Borg et al., 2004; Menard et al., 2009), suggesting that IM might mediate part of its therapeutic effect by an off-target effect. Indeed, several mouse tumor cell lines that did not respond to IM *in vitro* did so *in vivo* in immunocompetent mice. This therapeutic off-target effect of IM was mediated by NK cells and/or specialized DC subsets (Borg et al., 2004). We found that, by inhibiting c-Kit in DC, IM could promote a DC/NK cross-talk that ultimately stimulates NK cells to produce IFN-γ both in mice and in humans (Borg et al., 2004). Importantly, the IM-induced IFN-γ production by NK cells represented an independent predictor of long-term survival in advanced GIST treated with IM (Menard et al., 2009). Since IM failed to trigger NK cell IFN-γ production in about half of GIST patients, we launched a comprehensive analysis of the GIST-associated NK cell phenotype. At diagnosis, circulating NK cells from GIST patients (compared with healthy volunteers) exhibited a selective down-regulation of one particular type of stimulatory NK cell receptor, NKp30, but not that of another type, NKG2D, and this NKp30 down-regulation was only partially restored by IM (Menard et al., 2009). We demonstrated that the alternative splicing of exon 4, which affects the intracellular domain of NKp30, generates three membrane-bound proteins with distinct functions. Indeed, the NKp30a isoform could stimulate NK cell degranulation and Th1-type cytokine secretion, while the NKp30b isoform only signals for Th1 cytokine secretion and the NKp30c isoform transduced a delayed signal leading to IL-10 secretion. In a cohort of 80 patients with metastatic or recurrent GIST, the predominant expression of NKp30c was associated with decreased NKp30-dependent TNFα and CD107a release, compared to patients with high expression of NKp30a and/or NKp30b. The predominant expression of the NKp30c isoform was an independent prognostic factor of reduced overall survival (Delahaye et al., 2011). Freshly dissociated tumor samples revealed that GIST are highly infiltrated with NK cells (roughly 25% of $CD45^+$ leukocytes were $CD3^-CD56^+$ NK cells), and the density of NK cell infiltration was inversely correlated with metastases at diagnosis (Delahaye et al., 2011). Altogether, these data again support a more preventive than curative role for NK cells by counteracting metastatic spread. Since NK cells could play a crucial role in controlling tumor dissemination in GIST patients, we developed strategies for boosting NK cells along with IM treatment. Association of IM and IL-2 has been shown to have potent anti-tumor responses in mice through activation and trafficking of IKDC to lung metastases (Taieb et al., 2006). From 2009 to 2012, we launched a phase I clinical trial in patients with refractory solid tumors to determine the maximum tolerated dose of IL-2 combined with 400 mg daily IM. Data from this clinical trial will be reported soon. If the association appears to be non-toxic, a phase II study in GIST patients combining these two compounds will be considered. Other NK cell stimulatory compounds to be used in synergy with IM against GIST could be envisaged (**Figure 2**).

Thereby, it seems that NK cells could be a potent effector cells preventing tumor formation (immunosurveillance) and/or limiting metastatic spread. Previous study by Imai et al. (2000) had anticipated this type of conclusion in humans. This 11-year follow-up study showed a reduced cancer risk among people with strong or medium natural cytotoxic functions in peripheral blood, suggesting a role for natural immunological host defense mechanisms against cancer. However, and as described above, NK cells have difficulty entering the tumor therefore, strategies that could increase the penetration and/or proliferation and/or local differentiation of NK cells in the tumor remain attractive. Recently, the B16F10 transplantable mouse melanoma model transfected with chemerin, a chemoattractant for NK cells, macrophages, and DC subsets (Wittamer et al., 2003; Zabel et al., 2005; Parolini et al., 2007), led to a significant recruitment of NK cells in the tumor responsible for tumor regression (Pachynski et al., 2012). The authors showed that intra-tumor injection of the recombinant chemerin was sufficient to obtain tumor regression. Finally, in two independent clinical cohorts of melanoma patients, retention of

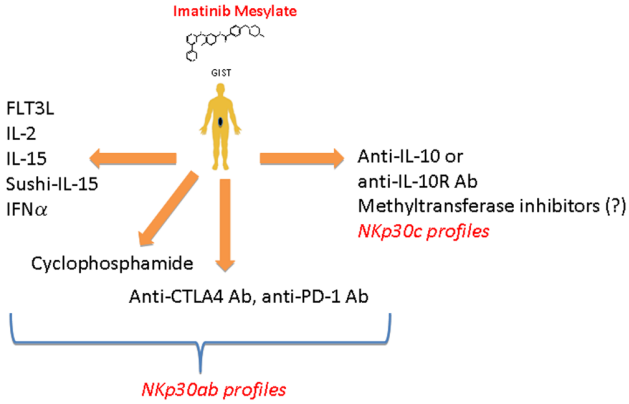


FIGURE 2 | Therapeutic strategies that could increase the functions of NK cells in patients with GIST. NK cells of patients with high expression of NKp30a and/or NKp30b isoforms could be reinvigorated using treatments that are know to favor either direct activation (IL-2, IFN-α, IL-15, sushi-IL-15) or indirect activation (FLT3, cyclophosphamide) of NK cells along with imatinib mesylate treatment. Since Balachandran et al. (2011) have shown that $CD8^+$ T cells could favor tumor regression it is conceivable to use drugs that will favor CD8 T cell activation (anti-PD1 or anti-CTLA4). In patients harboring the wrong NKp30 profile (high expression of NKp30c isoform) blocking IL-10 or IL-10 receptor (IL-10R) or using agent that could modify the NKp30 profile toward the NKp30ab profile (methyltransferase inhibitors?) might restore the NKp30-dependant NK cells function, thus favoring the control of tumor growth and/or dissemination.

high RARRES2 (a gene encoding the chemoattractant chemerin) expression correlated with better clinical outcomes (Pachynski et al., 2012).

CONCLUDING REMARKS

We are entering a new era of NK cell investigations in human malignancies that will open up new avenues for NK cell identification and profiling. How NK cell trafficking to tumors and/or differentiate from precursors in tumors remain an active conundrum. How NK cells prevent metastases is obscure. How NK cells regulate adaptive immunity is still debated since NK can shut down or instead trigger DC or $CD4^+$ T cells. How to strengthen the functions of NK cells and/or neutralize the immunosuppressive factors should be harnessed (e.g., IL-2, IL-15, sushi IL-15, IFN-α, and peptide inhibitors of TGF-β1; **Figure 2**).

REFERENCES

Aboud, M., Kingsmore, S., and Segal, S. (1993). Role of natural killer cells in controlling local tumor formation and metastatic manifestation of different 3LL Lewis lung carcinoma cell clones. *Nat. Immunol.* 12, 17–24.

Al-Shibli, K., Al-Saad, S., Donnem, T., Persson, M., Bremnes, R. M., and Busund, L. T. (2009). The prognostic value of intraepithelial and stromal innate immune system cells in non-small cell lung carcinoma. *Histopathology* 55, 301–312.

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

Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Phillips, J. H., Lanier, L. L., et al. (1999). Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 285, 727–729.

Beilke, J. N., Kuhl, N. R., Van Kaer, L., and Gill, R. G. (2005). NK cells promote islet allograft tolerance via a perforin-dependent mechanism. *Nat. Med.* 11, 1059–1065.

Bidwell, B. N., Slaney, C. Y., Withana, N. P., Forster, S., Cao, Y., Loi, S., et al. (2012). Silencing of Irf7 pathways in breast cancer cells promotes bone metastasis through immune escape. *Nat. Med.* doi: 10.1038/nm.2830 [Epub ahead of print].

Blackhall, F. H., Merry, C. L., Davies, E. J., and Jayson, G. C. (2001). Heparan sulfate proteoglycans and cancer. *Br. J. Cancer* 85, 1094–1098.

Bloushtain, N., Qimron, U., Bar-Ilan, A., Hershkovitz, O., Gazit, R., Fima, E., et al. (2004). Membrane-associated heparan sulfate proteoglycans are involved in the recognition of cellular targets by NKp30 and NKp46. *J. Immunol.* 173, 2392–2401.

Borg, C., Jalil, A., Laderach, D., Maruyama, K., Wakasugi, H., Charrier, S., et al. (2004). NK cell activation by dendritic cells (DCs) requires the formation of a synapse leading to IL-12 polarization in DCs. *Blood* 104, 3267–3275.

Braud, V. M., Allan, D. S., O'Callaghan, C. A., Soderstrom, K., D'Andrea, A., Ogg, G. S., et al. (1998). HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 391, 795–799.

Burt, B. M., Plitas, G., Stableford, J. A., Nguyen, H. M., Bamboat, Z. M., Pillarisetty, V. G., et al. (2008). CD11c identifies a subset of murine liver natural killer cells that responds to adenoviral hepatitis. *J. Leukoc. Biol.* 84, 1039–1046.

Cagnano, E., Hershkovitz, O., Zilka, A., Bar-Ilan, A., Golder, A., Sion-Vardy, N., et al. (2008). Expression of ligands to NKp46 in benign and malignant melanocytes. *J. Invest. Dermatol.* 128, 972–979.

Cameron, S., Haller, F., Dudas, J., Moriconi, F., Gunawan, B., Armbrust, T., et al. (2008). Immune cells in primary gastrointestinal stromal tumors. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 20, 327–334.

Campbell, J. J., Qin, S., Unutmaz, D., Soler, D., Murphy, K. E., Hodge, M. R., et al. (2001). Unique subpopulations of CD56+ NK and NK-T peripheral blood lymphocytes identified by chemokine receptor expression repertoire. *J. Immunol.* 166, 6477–6482.

Carrega, P., Morandi, B., Costa, R., Frumento, G., Forte, G., Altavilla, G., et al. (2008). Natural killer cells infiltrating human nonsmall-cell lung cancer are enriched in CD56 bright CD16(−) cells and display an impaired capability to kill tumor cells. *Cancer* 112, 863–875.

Cella, M., Fuchs, A., Vermi, W., Facchetti, F., Otero, K., Lennerz, J. K., et al. (2009). A human natural killer cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity. *Nature* 457, 722–725.

Chan, C. W., Crafton, E., Fan, H. N., Flook, J., Yoshimura, K., Skarica, M., et al. (2006). Interferon-producing killer dendritic cells provide a link between innate and adaptive immunity. *Nat. Med.* 12, 207–213.

Chiossone, L., Chaix, J., Fuseri, N., Roth, C., Vivier, E., and Walzer, T. (2009). Maturation of mouse NK cells is a 4-stage developmental program. *Blood* 113, 5488–5496.

Chow, M. T., Sceneay, J., Paget, C., Wong, C. S., Duret, H., Tschopp, J., et al. (2012). NLRP3 suppresses NK cell-mediated responses to carcinogen-induced tumors and metastases. *Cancer Res.* 72, 5721–5732.

Colonna, M. (2009). Interleukin-22-producing natural killer cells and lymphoid tissue inducer-like cells in mucosal immunity. *Immunity* 31, 15–23.

Cooper, M. A., Fehniger, T. A., and Caligiuri, M. A. (2001). The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol.* 22, 633–640.

Cosman, D., Mullberg, J., Sutherland, C. L., Chin, W., Armitage, R., Fanslow, W., et al. (2001). ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity* 14, 123–133.

Das, B., Tsuchida, R., Malkin, D., Koren, G., Baruchel, S., and Yeger, H. (2008). Hypoxia enhances tumor stemness by increasing the invasive and tumorigenic side population fraction. *Stem Cells* 26, 1818–1830.

De Maria, A., Bozzano, F., Cantoni, C., and Moretta, L. (2011). Revisiting human natural killer cell subset function revealed cytolytic CD56(dim)CD16+ NK cells as rapid producers of abundant IFN-gamma on activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 728–732.

Delahaye, N. F., Rusakiewicz, S., Martins, I., Menard, C., Roux, S., Lyonnet, L., et al. (2011). Alternatively spliced NKp30 isoforms affect the prognosis of gastrointestinal stromal tumors. *Nat. Med.* 17, 700–707.

Diefenbach, A., Jensen, E. R., Jamieson, A. M., and Raulet, D. H. (2001). Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. *Nature* 413, 165–171.

Doherty, D. G., and O'Farrelly, C. (2000). Innate and adaptive lymphoid cells in the human liver. *Immunol. Rev.* 174, 5–20.

Dunn, C., Brunetto, M., Reynolds, G., Christophides, T., Kennedy, P. T., Lampertico, P., et al. (2007). Cytokines induced during chronic hepatitis B virus infection promote a pathway for NK cell-mediated liver damage. *J. Exp. Med.* 204, 667–680.

Ebata, K., Shimizu, Y., Nakayama, Y., Minemura, M., Murakami, J., Kato, T., et al. (2006). Immature NK cells suppress dendritic cell functions during the development of leukemia in a mouse model. *J. Immunol.* 176, 4113–4124.

Ebert, L. M., Meuter, S., and Moser, B. (2006). Homing and function of human skin gammadelta T cells and NK cells: relevance for tumor surveillance. *J. Immunol.* 176, 4331–4336.

Eckhardt, B. L., Parker, B. S., Van Laar, R. K., Restall, C. M., Natoli, A. L., Tavaria, M. D., et al. (2005). Genomic analysis of a spontaneous model of breast cancer metastasis to bone reveals a role for the extracellular matrix. *Mol. Cancer Res.* 3, 1–13.

Erdag, G., Schaefer, J. T., Smolkin, M. E., Deacon, D. H., Shea, S. M., Dengel, L. T., et al. (2012). Immunotype and immunohistologic characteristics of tumor-infiltrating immune cells are associated with clinical outcome in metastatic melanoma. *Cancer Res.* 72, 1070–1080.

Fauriat, C., Long, E. O., Ljunggren, H. G., and Bryceson, Y. T. (2010). Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood* 115, 2167–2176.

Ferlazzo, G., Thomas, D., Lin, S. L., Goodman, K., Morandi, B., Muller, W. A., et al. (2004). The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytolytic. *J. Immunol.* 172, 1455–1462.

Friese, M. A., Platten, M., Lutz, S. Z., Naumann, U., Aulwurm, S., Bischof, F., et al. (2003). MICA/NKG2D-mediated immunogene therapy of experimental gliomas. *Cancer Res.* 63, 8996–9006.

Gannon, P. O., Poisson, A. O., Delvoye, N., Lapointe, R., Mes-Masson, A. M., and Saad, F. (2009). Characterization of the intra-prostatic immune cell infiltration in androgen-deprived prostate cancer patients. *J. Immunol. Methods* 348, 9–17.

Glas, R., Franksson, L., Une, C., Eloranta, M. L., Ohlen, C., Orn, A., et al. (2000). Recruitment and activation of natural killer (NK) cells *in vivo* determined by the target cell phenotype. An adaptive component of NK cell-mediated responses. *J. Exp. Med.* 191, 129–138.

Glas, R., Sturmhofel, K., Hammerling, G. J., Karre, K., and Ljunggren, H. G. (1992). Restoration of a tumorigenic phenotype by beta 2-microglobulin transfection to EL-4 mutant cells. *J. Exp. Med.* 175, 843–846.

Gorelik, E., Wiltrout, R. H., Okumura, K., Habu, S., and Herberman, R. B. (1982). Role of NK cells in the control of metastatic spread and growth of tumor cells in mice. *Int. J. Cancer* 30, 107–112.

Groh, V., Bahram, S., Bauer, S., Herman, A., Beauchamp, M., and Spies, T. (1996). Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 12445–12450.

Guerra, N., Tan, Y. X., Joncker, N. T., Choy, A., Gallardo, F., Xiong, N., et al. (2008). NKG2D-deficient mice are defective in tumor surveillance in models of spontaneous malignancy. *Immunity* 28, 571–580.

Guimont-Desrochers, F., Boucher, G., Dong, Z., Dupuis, M., Veillette, A., and Lesage, S. (2012). Redefining interferon-producing killer dendritic cells as a novel intermediate in NK-cell differentiation. *Blood* 119, 4349–4357.

Gulubova, M., Manolova, I., Kyurkchiev, D., Julianov, A., and Altunkova, I. (2009). Decrease in intrahepatic CD56+ lymphocytes in gastric and colorectal cancer patients with liver metastases. *APMIS* 117, 870–879.

Halama, N., Braun, M., Kahlert, C., Spille, A., Quack, C., Rahbari, N., et al. (2011). Natural killer cells are scarce in colorectal carcinoma tissue despite high levels of chemokines and cytokines. *Clin. Cancer Res.* 17, 678–689.

Hayakawa, Y., and Smyth, M. J. (2006). CD27 dissects mature NK cells into two subsets with distinct responsiveness and migratory capacity. *J. Immunol.* 176, 1517–1524.

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

Hecht, M. L., Rosental, B., Horlacher, T., Hershkovitz, O., De Paz, J. L., Noti, C., et al. (2009). Natural cytotoxicity receptors NKp30, NKp44 and NKp46 bind to different heparan sulfate/heparin sequences. *J. Proteome Res.* 8, 712–720.

Heddleston, J. M., Li, Z., Mclendon, R. E., Hjelmeland, A. B., and Rich, J. N. (2009). The hypoxic microenvironment maintains glioblastoma stem cells and promotes reprogramming towards a cancer stem cell phenotype. *Cell Cycle* 8, 3274–3284.

Hershkovitz, O., Jarahian, M., Zilka, A., Bar-Ilan, A., Landau, G., Jivov, S., et al. (2008). Altered glycosylation of recombinant NKp30 hampers binding to heparan sulfate: a lesson for the use of recombinant immunoreceptors as an immunological tool. *Glycobiology* 18, 28–41.

Hershkovitz, O., Jivov, S., Bloushtain, N., Zilka, A., Landau, G., Bar-Ilan, A., et al. (2007). Characterization of the recognition of tumor cells by the natural cytotoxicity receptor, NKp44. *Biochemistry* 46, 7426–7436.

Hiby, S. E., Walker, J. J., O'Shaughnessy K, M., Redman, C. W., Carrington, M., Trowsdale, J., et al. (2004). Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success. *J. Exp. Med.* 200, 957–965.

Imai, K., Matsuyama, S., Miyake, S., Suga, K., and Nakachi, K. (2000). Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet* 356, 1795–1799.

Izawa, S., Kono, K., Mimura, K., Kawaguchi, Y., Watanabe, M., Maruyama, T., et al. (2011). H(2)O(2) production within tumor microenvironment inversely correlated with infiltration of CD56(dim) NK cells in gastric and esophageal cancer: possible mechanisms of NK cell dysfunction. *Cancer Immunol. Immunother.* 60, 1801–1810.

Jarahian, M., Fiedler, M., Cohnen, A., Djandji, D., Hammerling, G. J., Gati, C., et al. (2011). Modulation of NKp30- and NKp46-mediated natural killer cell responses by poxviral hemagglutinin. *PLoS Pathog.* 7:e1002195. doi: 10.1371/journal.ppat.1002195

Jayson, G. C., Lyon, M., Paraskeva, C., Turnbull, J. E., Deakin, J. A., and Gallagher, J. T. (1998). Heparan sulfate undergoes specific structural changes during the progression from human colon adenoma to carcinoma *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 273, 51–57.

Jewett, A., and Tseng, H. C. (2011). Tumor induced inactivation of natural killer cell cytotoxic function; implication in growth, expansion and differentiation of cancer stem cells. *J. Cancer* 2, 443–457.

Jewett, A., Tseng, H. C., Arasteh, A., Saadat, S., Christensen, R. E., and Cacalano, N. A. (2012). Natural killer cells preferentially target cancer stem cells; role of monocytes in protection against NK cell mediated lysis of cancer stem cells. *Curr. Drug Deliv.* 9, 5–16.

Karre, K., Ljunggren, H. G., Piontek, G., and Kiessling, R. (1986). Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 319, 675–678.

Kelly, J. M., Darcy, P. K., Markby, J. L., Godfrey, D. I., Takeda, K., Yagita, H., et al. (2002). Induction of tumor-specific T cell memory by NK cell-mediated tumor rejection. *Nat. Immunol.* 3, 83–90.

Kim, S., Iizuka, K., Kang, H. S., Dokun, A., French, A. R., Greco, S., et al. (2002). *In vivo* developmental stages in murine natural killer cell maturation. *Nat. Immunol.* 3, 523–528.

Koh, C. Y., Blazar, B. R., George, T., Welniak, L. A., Capitini, C. M., Raziuddin, A., et al. (2001). Augmentation of antitumor effects by NK cell inhibitory receptor blockade *in vitro* and *in vivo*. *Blood* 97, 3132–3137.

Kreisel, D., Gelman, A. E., Higashikubo, R., Lin, X., Vikis, H. G., White, J. M., et al. (2012). Strain-specific variation in murine natural killer gene complex contributes to differences in immunosurveillance for urethane-induced lung cancer. *Cancer Res.* 72, 4311–4317.

Ksienzyk, A., Neumann, B., Nandakumar, R., Finsterbusch, K., Grashoff, M., Zawatzky, R., et al. (2011). IRF-1 expression is essential for natural killer cells to suppress metastasis. *Cancer Res.* 71, 6410–6418.

Lakshmikanth, T., Burke, S., Ali, T. H., Kimpfler, S., Ursini, F., Ruggeri, L., et al. (2009). NCRs and DNAM-1 mediate NK cell recognition and lysis of human and mouse melanoma cell lines in vitro and *in vivo*. *J. Clin. Invest.* 119, 1251–1263.

Lanier, L. L., Le, A. M., Civin, C. I., Loken, M. R., and Phillips, J. H. (1986). The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J. Immunol.* 136, 4480–4486.

Lelekakis, M., Moseley, J. M., Martin, T. J., Hards, D., Williams, E., Ho, P., et al. (1999). A novel orthotopic model of breast cancer metastasis to bone. *Clin. Exp. Metastasis* 17, 163–170.

Liu, C., Yu, S., Kappes, J., Wang, J., Grizzle, W. E., Zinn, K. R., et al. (2007). Expansion of spleen myeloid suppressor cells represses NK cell cytotoxicity in tumor-bearing host. *Blood* 109, 4336–4342.

Ljunggren, H. G., and Karre, K. (1985). Host resistance directed selectively against H-2-deficient lymphoma variants. Analysis of the mechanism. *J. Exp. Med.* 162, 1745–1759.

Luci, C., Reynders, A., Ivanov, I. I., Cognet, C., Chiche, L., Chasson, L., et al. (2009). Influence of the transcription factor RORgammat on the development of NKp46+ cell populations in gut and skin. *Nat. Immunol.* 10, 75–82.

Mamessier, E., Sylvain, A., Bertucci, F., Castellano, R., Finetti, P., Houvenaeghel, G., et al. (2011a). Human breast tumor cells induce self-tolerance mechanisms to avoid NKG2D-mediated and DNAM-mediated NK cell recognition. *Cancer Res.* 71, 6621–6632.

Mamessier, E., Sylvain, A., Thibult, M. L., Houvenaeghel, G., Jacquemier, J., Castellano, R., et al. (2011b). Human breast cancer cells enhance self tolerance by promoting evasion from NK cell antitumor immunity. *J. Clin. Invest.* 121, 3609–3622.

Mani, S. A., Guo, W., Liao, M. J., Eaton, E. N., Ayyanan, A., Zhou, A. Y., et al. (2008). The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 133, 704–715.

Marechal, R., De Schutter, J., Nagy, N., Demetter, P., Lemmers, A., Deviere, J., et al. (2010). Putative contribution of CD56 positive cells in cetuximab treatment efficacy in first-line metastatic colorectal cancer patients. *BMC Cancer* 10:340. doi: 10.1186/1471-2407-10-340

Mauti, L. A., Le Bitoux, M. A., Baumer, K., Stehle, J. C., Golshayan, D., Provero, P., et al. (2011). Myeloid-derived suppressor cells are implicated in regulating permissiveness for tumor metastasis during mouse gestation. *J. Clin. Invest.* 121, 2794–2807.

Menard, C., Blay, J. Y., Borg, C., Michiels, S., Ghiringhelli, F., Robert, C., et al. (2009). Natural killer cell IFN-gamma levels predict long-term survival with imatinib mesylate therapy in gastrointestinal stromal tumor-bearing patients. *Cancer Res.* 69, 3563–3569.

Menon, A. G., Janssen-Van Rhijn, C. M., Morreau, H., Putter, H., Tollenaar,

R. A., Van De Velde, C. J., et al. (2004). Immune system and prognosis in colorectal cancer: a detailed immunohistochemical analysis. *Lab. Invest.* 84, 493–501.

Moretta, A., Bottino, C., Vitale, M., Pende, D., Biassoni, R., Mingari, M. C., et al. (1996). Receptors for HLA class-I molecules in human natural killer cells. *Annu. Rev. Immunol.* 14, 619–648.

Noval Rivas, M., Hazzan, M., Weatherly, K., Gaudray, F., Salmon, I., and Braun, M. Y. (2010). NK cell regulation of CD4 T cell-mediated graft-versus-host disease. *J. Immunol.* 184, 6790–6798.

Ochi, M., Ohdan, H., Mitsuta, H., Onoe, T., Tokita, D., Hara, H., et al. (2004). Liver NK cells expressing TRAIL are toxic against self hepatocytes in mice. *Hepatology* 39, 1321–1331.

Pachynski, R. K., Zabel, B. A., Kohrt, H. E., Tejeda, N. M., Monnier, J., Swanson, C. D., et al. (2012). The chemoattractant chemerin suppresses melanoma by recruiting natural killer cell antitumor defenses. *J. Exp. Med.* 209, 1427–1435.

Parham, P. (2004). NK cells and trophoblasts: partners in pregnancy. *J. Exp. Med.* 200, 951–955.

Park, M. H., Lee, J. S., and Yoon, J. H. (2012). High expression of CX3CL1 by tumor cells correlates with a good prognosis and increased tumor-infiltrating CD8+ T cells, natural killer cells, and dendritic cells in breast carcinoma. *J. Surg. Oncol.* 106, 386–392.

Parolini, S., Santoro, A., Marcenaro, E., Luini, W., Massardi, L., Facchetti, F., et al. (2007). The role of chemerin in the colocalization of NK and dendritic cell subsets into inflamed tissues. *Blood* 109, 3625–3632.

Paust, S., Gill, H. S., Wang, B. Z., Flynn, M. P., Moseman, E. A., Senman, B., et al. (2010). Critical role for the chemokine receptor CXCR6 in NK cell-mediated antigen-specific memory of haptens and viruses. *Nat. Immunol.* 11, 1127–1135.

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

Perona-Wright, G., Mohrs, K., Szaba, F. M., Kummer, L. W., Madan, R., Karp, C. L., et al. (2009). Systemic but not local infections elicit immunosuppressive IL-10 production by natural killer cells. *Cell Host Microbe* 6, 503–512.

Pillarisetty, V. G., Katz, S. C., Bleier, J. I., Shah, A. B., and Dematteo, R. P. (2005). Natural killer dendritic cells have both antigen presenting and lytic function and in response to CpG produce IFN-gamma via autocrine IL-12. *J. Immunol.* 174, 2612–2618.

Platonova, S., Cherfils-Vicini, J., Damotte, D., Crozet, L., Vieillard, V., Validire, P., et al. (2011). Profound coordinated alterations of intratumoral NK cell phenotype and function in lung carcinoma. *Cancer Res.* 71, 5412–5422.

Plitas, G., Chaudhry, U. I., Kingham, T. P., Raab, J. R., and Dematteo, R. P. (2007). NK dendritic cells are innate immune responders to *Listeria monocytogenes* infection. *J. Immunol.* 178, 4411–4416.

Pogge von Strandmann, E., Simhadri, V. R., Von Tresckow, B., Sasse, S., Reiners, K. S., Hansen, H. P., et al. (2007). Human leukocyte antigen-B-associated transcript 3 is released from tumor cells and engages the NKp30 receptor on natural killer cells. *Immunity* 27, 965–974.

Polyak, K., and Weinberg, R. A. (2009). Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat. Rev. Cancer* 9, 265–273.

Raimondi, C., Gianni, W., Cortesi, E., and Gazzaniga, P. (2010). Cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition: revisiting minimal residual disease. *Curr. Cancer Drug Targets* 10, 496–508.

Rosental, B., Brusilovsky, M., Hadad, U., Oz, D., Appel, M. Y., Afergan, F., et al. (2011). Proliferating cell nuclear antigen is a novel inhibitory ligand for the natural cytotoxicity receptor NKp44. *J. Immunol.* 187, 5693–5702.

Sandel, M. H., Speetjens, F. M., Menon, A. G., Albertsson, P. A., Basse, P. H., Hokland, M., et al. (2005). Natural killer cells infiltrating colorectal cancer and MHC class I expression. *Mol. Immunol.* 42, 541–546.

Santoni, A., Zingoni, A., Cerboni, C., and Gismondi, A. (2007). Natural killer (NK) cells from killers to regulators: distinct features between peripheral blood and decidual NK cells. *Am. J. Reprod. Immunol.* 58, 280–288.

Satoh-Takayama, N., Vosshenrich, C. A., Lesjean-Pottier, S., Sawa, S., Lochner, M., Rattis, F., et al. (2008). Microbial flora drives interleukin 22 production in intestinal NKp46+ cells that provide innate mucosal immune defense. *Immunity* 29, 958–970.

Sceneay, J., Chow, M. T., Chen, A., Halse, H. M., Wong, C. S., Andrews, D. M., et al. (2012). Primary tumor hypoxia recruits CD11b+/Ly6Cmed/Ly6G+ immune suppressor cells and compromises NK cell cytotoxicity in the premetastatic niche. *Cancer Res.* 72, 3906–3911.

Schulthess, J., Meresse, B., Ramiro-Puig, E., Montcuquet, N., Darche, S., Begue, B., et al. (2012). Interleukin-15-dependent NKp46+ innate lymphoid cells control intestinal inflammation by recruiting inflammatory monocytes. *Immunity* 37, 108–121.

Sconocchia, G., Arriga, R., Tornillo, L., Terracciano, L., Ferrone, S., and Spagnoli, G. C. (2012). Melanoma cells inhibit NK cell functions – letter. *Cancer Res.* 72, 5428–5429.

Sconocchia, G., Spagnoli, G. C., Del Principe, D., Ferrone, S., Anselmi, M., Wongsena, W., et al. (2009). Defective infiltration of natural killer cells in MICA/B-positive renal cell carcinoma involves beta(2)-integrin-mediated interaction. *Neoplasia* 11, 662–671.

Sconocchia, G., Zlobec, I., Lugli, A., Calabrese, D., Iezzi, G., Karamitopoulou, E., et al. (2010). Tumor infiltration by FcgammaRIII (CD16)+ myeloid cells is associated with improved survival in patients with colorectal carcinoma. *Int. J. Cancer* 128, 2663–2672.

Shi, F. D., Ljunggren, H. G., La Cava, A., and Van Kaer, L. (2011). Organ-specific features of natural killer cells. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 658–671.

Silva, A., Andrews, D. M., Brooks, A. G., Smyth, M. J., and Hayakawa, Y. (2008). Application of CD27 as a marker for distinguishing human NK cell subsets. *Int. Immunol.* 20, 625–630.

Simhadri, V. R., Reiners, K. S., Hansen, H. P., Topolar, D., Simhadri, V. L., Nohroudi, K., et al. (2008). Dendritic cells release HLA-B-associated transcript-3 positive exosomes to regulate natural killer function. *PLoS ONE* 3:e3377. doi: 10.1371/journal.pone.0003377

Smyth, M. J., Crowe, N. Y., and Godfrey, D. I. (2001). NK cells and NKT cells collaborate in host protection from methylcholanthrene-induced fibrosarcoma. *Int. Immunol.* 13, 459–463.

Smyth, M. J., Thia, K. Y., Street, S. E., Macgregor, D., Godfrey, D. I., and Trapani, J. A. (2000). Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. *J. Exp. Med.* 192, 755–760.

Spits, H., and Di Santo, J. P. (2011). The expanding family of innate lymphoid cells: regulators and effectors of immunity and tissue remodeling. *Nat. Immunol.* 12, 21–27.

Stegmann, K. A., Bjorkstrom, N. K., Veber, H., Ciesek, S., Riese, P., Wiegand, J., et al. (2010). Interferon-alpha-induced TRAIL on natural killer cells is associated with control of hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 138, 1885–1897.

Stoimenov, I., and Helleday, T. (2009). PCNA on the crossroad of cancer. *Biochem. Soc. Trans.* 37, 605–613.

Street, S. E., Cretney, E., and Smyth, M. J. (2001). Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. *Blood* 97, 192–197.

Taieb, J., Chaput, N., Menard, C., Apetoh, L., Ullrich, E., Bonmort, M., et al. (2006). A novel dendritic cell subset involved in tumor immunosurveillance. *Nat. Med.* 12, 214–219.

Takanami, I., Takeuchi, K., and Giga, M. (2001). The prognostic value of natural killer cell infiltration in resected pulmonary adenocarcinoma. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 121, 1058–1063.

Takeda, K., Cretney, E., Hayakawa, Y., Ota, T., Akiba, H., Ogasawara, K., et al. (2005). TRAIL identifies immature natural killer cells in newborn mice and adult mouse liver. *Blood* 105, 2082–2089.

Takeda, K., Nakayama, M., Sakaki, M., Hayakawa, Y., Imawari, M., Ogasawara, K., et al. (2011). IFN-gamma production by lung NK cells is critical for the natural resistance to pulmonary metastasis of B16 melanoma in mice. *J. Leukoc. Biol.* 90, 777–785.

Talmadge, J. E., Meyers, K. M., Prieur, D. J., and Starkey, J. R. (1980). Role of NK cells in tumour growth and metastasis in beige mice. *Nature* 284, 622–624.

Terme, M., Mignot, G., Ullrich, E., Bonmort, M., Minard-Colin, V., Jacquet, A., et al. (2009). The dendritic cell-like functions of IFN-producing killer dendritic cells reside in the CD11b+ subset and are licensed by tumor cells. *Cancer Res.* 69, 6590–6597.

Terme, M., Ullrich, E., Aymeric, L., Meinhardt, K., Coudert, J. D., Desbois, M., et al. (2012). Cancer-induced immunosuppression: IL-18-elicited immunoablative NK cells. *Cancer Res.* 72, 2757–2767.

Tseng, H. C., Arasteh, A., Paranjpe, A., Teruel, A., Yang, W., Behel, A., et al. (2010). Increased lysis of stem cells but not their differentiated cells by natural killer cells; de-differentiation or reprogramming activates NK cells. *PLoS*

ONE 5:e11590. doi: 10.1371/journal.pone.0011590

Tu, Z., Bozorgzadeh, A., Pierce, R. H., Kurtis, J., Crispe, I. N., and Orloff, M. S. (2008). TLR-dependent cross talk between human Kupffer cells and NK cells. *J. Exp. Med.* 205, 233–244.

van Zijl, F., Zulehner, G., Petz, M., Schneller, D., Kornauth, C., Hau, M., et al. (2009). Epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Future Oncol.* 5, 1169–1179.

Vanderkerken, K., Bouwens, L., De Neve, W., Van Den Berg, K., Baekeland, M., Delens, N., et al. (1993). Origin and differentiation of hepatic natural killer cells (pit cells). *Hepatology* 18, 919–925.

Vetter, C. S., Groh, V., Thor Straten, P., Spies, T., Brocker, E. B., and Becker, J. C. (2002). Expression of stress-induced MHC class I related chain molecules on human melanoma. *J. Invest. Dermatol.* 118, 600–605.

Villegas, F. R., Coca, S., Villarrubia, V. G., Jimenez, R., Chillon, M. J., Jareno, J., et al. (2002). Prognostic significance of tumor infiltrating natural killer cells subset CD57 in patients with squamous cell lung cancer. *Lung Cancer* 35, 23–28.

Vivier, E., Ugolini, S., Blaise, D., Chabannon, C., and Brossay, L. (2012). Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 239–252.

Vossen, M. T., Matmati, M., Hertoghs, K. M., Baars, P. A., Gent, M. R., Leclercq, G., et al. (2008). CD27 defines phenotypically and functionally different human NK cell subsets. *J. Immunol.* 180, 3739–3745.

Vosshenrich, C. A., Garcia-Ojeda, M. E., Samson-Villeger, S. I., Pasqualetto, V., Enault, L., Richard-Le Goff, O., et al. (2006). A thymic pathway of mouse natural killer cell development characterized by expression of GATA-3 and CD127. *Nat. Immunol.* 7, 1217–1224.

Vosshenrich, C. A., Lesjean-Pottier, S., Hasan, M., Richard-Le Goff, O., Corcuff, E., Mandelboim, O., et al. (2007). CD11cloB220+ interferon-producing killer dendritic cells are activated natural killer cells. *J. Exp. Med.* 204, 2569–2578.

Watson, N. F., Spendlove, I., Madjd, Z., Mcgilvray, R., Green, A. R., Ellis, I. O., et al. (2006). Expression of the stress-related MHC class I chain-related protein MICA is an indicator of good prognosis in colorectal cancer patients. *Int. J. Cancer* 118, 1445–1452.

Whitelaw, P. F., and Croy, B. A. (1996). Granulated lymphocytes of pregnancy. *Placenta* 17, 533–543.

Wittamer, V., Franssen, J. D., Vulcano, M., Mirjolet, J. F., Le Poul, E., Migeotte, I., et al. (2003). Specific recruitment of antigen-presenting cells by chemerin, a novel processed ligand from human inflammatory fluids. *J. Exp. Med.* 198, 977–985.

Yu, Y., Ramena, G., and Elble, R. C. (2012). The role of cancer stem cells in relapse of solid tumors. *Front. Biosci. (Elite Ed.)* 4, 1528–1541.

Zabel, B. A., Silverio, A. M., and Butcher, E. C. (2005). Chemokine-like receptor 1 expression and chemerin-directed chemotaxis distinguish plasmacytoid from myeloid dendritic cells in human blood. *J. Immunol.* 174, 244–251.

Zhou, R., Wei, H., and Tian, Z. (2007). NK3-like NK cells are involved in protective effect of polyinosinic-polycytidylic acid on type 1 diabetes in nonobese diabetic mice. *J. Immunol.* 178, 2141–2147.

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

Received: 16 November 2012; paper pending published: 05 December 2012; accepted: 06 December 2012; published online: 24 December 2012.

Citation: Desbois M, Rusakiewicz S, Locher C, Zitvogel L and Chaput N (2012) Natural killer cells in non-hematopoietic malignancies. Front. Immun. ***3****:395. doi: 10.3389/fimmu. 2012.00395*

This article was submitted to Frontiers in NK Cell Biology, a specialty of Frontiers in Immunology.

Copyright © 2012 Desbois, Rusakiewicz, Locher, Zitvogel and Chaput. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in other forums, provided the original authors and source are credited and subject to any copyright notices concerning any third-party graphics etc.

TITRE : Optimisation d'une stratégie thérapeutique antitumorale conventionnelle par association à une immunothérapie : Etude de phase I combinant l'Imatinib à l'Interleukine-2

AUTEUR : Clara LOCHER

RESUME : Chef de file des inhibiteurs de tyrosines kinase, l'Imatinib Mesylate (IM) a révolutionné la prise en charge de la leucémie myéloïde chronique et des tumeurs stromales gastro-intestiales. En plus de son action directe sur les cellules tumorales, une partie de l'efficacité thérapeutique de l'IM a été attribuée à son aptitude à moduler la réponse immunitaire. Cette propriété soulève la possibilité que les résultats cliniques de l'IM pourraient être améliorés en le combinant efficacement à une immunothérapie. A cet effet, nous avons montré dans un modèle préclinique que l'interleukine-2 (IL-2) – adjuvant des cellules NK – augmente l'efficacité de l'IM. Nous avons également démontré une efficacité supérieure de l'IM en association au cyclophosphamide (CTX) du fait de l'inhibition des lymphocytes T régulateurs. Nous avons donc entrepris un essai clinique de phase 1 associant l'IM, l'IL-2 et le CTX chez des patients ayant une tumeur solide métastatique ou localement avancée. Les objectifs de cet essai sont (i) de déterminer la dose maximale tolérée d'IL-2 associée à l'IM et au CTX ; (ii) d'étudier les paramètres pharmacocinétiques de l'association ; (iii) d'évaluer l'efficacité de l'association et (iv) son effet sur les effecteurs de l'immunité. Au total, 17 patients ont été inclus dans cette étude. La DMT d'IL-2 associée à la dose fixe de 400 mg d'IM correspond à 6 MUI/j. A ce niveau de dose, tous les patients ont présenté au moins un effet indésirable imputable au traitement : principalement fièvre et frissons, augmentation des enzymes hépatiques, asthénie et nausée mais sans que ne soit observée de toxicité limitante. L'étude des paramètres pharmacocinétiques révèle une augmentation significative de l'exposition systémique à l'IM en fin de cycle et qui semble être imputable à l'IL-2. La pharmacocinétique de l'IL-2 n'est par contre pas modifiée par l'administration concomitante d'IM. Sur le plan des effecteurs de l'immunité, l'association IM, IL-2 et CTX diminue le taux de lymphocytes B, lymphocytes T (LT) $CD4^+$ et LT $CD8^+$ mais active les cellules NK puisqu'on observe une augmentation des marqueurs $CD56^{bright}$, HLA-DR et TRAIL. De manière intéressante, la sous-population de cellules NK HLA-DR^+ possède des capacités de dégranulation plus importante après exposition à cette association et son expansion est associée à une meilleure survie. Cette association pourrait donc s'avérer particulièrement intéressante dans le traitement de tumeurs sensibles d'une part à l'IM et d'autre part à la lyse par les cellules NK. Les GIST étant particulièrement sensibles à l'IM, nous avons étudié l'infiltrat tumoral présent au niveau de ses tumeurs. Nous avons ainsi pu mettre en évidence le rôle pronostique de l'infiltrat en LT et NK sur la survie sans progression des GIST. En vue d'une étude de phase 2, les GIST apparaissent donc être un modèle tumoral particulièrement pertinent pour évaluer les bénéfices de l'association IM, IL-2 et CTX.

LABORATOIRE D'ACCUEIL : INSERM U1015, Institut Gustave Roussy, 114 rue Edouard Vaillant 94800 Villejuif.