Etude de l'impact clinique et immunologique d'un traitement par lénalidomide dans la maladie de Kaposi liée au VIH

Aude Desnoyer

▶ **To cite this version:**

Aude Desnoyer. Etude de l'impact clinique et immunologique d'un traitement par lénalidomide dans la maladie de Kaposi liée au VIH. Maladies infectieuses. Université Paris Saclay (COmUE), 2015. Français. NNT : 2015SACLS017 . tel-01423883

HAL Id: tel-01423883
https://theses.hal.science/tel-01423883

Submitted on 1 Jan 2017

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

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

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

ECOLE DOCTORALE :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUÉ

PÔLE : IMMUNOLOGIE ET BIOTHERAPIES

DISCIPLINE : IMMUNOLOGIE

ANNÉES 2012 – 2015 SÉRIE DOCTORAT N° 2015SACLS017

THÈSE DE DOCTORAT

soutenue le 05/10/2015

par

Aude DESNOYER

Etude de l'impact clinique et immunologique d'un traitement par lénalidomide dans la maladie de Kaposi liée au VIH

Directeur de thèse :	Valérie MARTINEZ-POURCHER	MCU-PH (INSERM U996, UPMC)
Co-directeur de thèse :	Karl BALABANIAN	CR1 (INSERM U996, Univ. Paris-Sud)

Composition du jury :

Président du jury :	Olivier LAMBOTTE	PU-PH (INSERM U1184, Univ. Paris-Sud)
Rapporteurs :	Vincent CALVEZ	PU-PH (INSERM U1136, UPMC)
	Jean-Daniel LELIEVRE	PU-PH (INSERM U955, Univ. Paris 12)
Examinateurs :	Françoise BACHELERIE	DR1 (INSERM U996, Univ. Paris-Sud)
	Eric CAUMES	PU-PH (INSERM U1136, UPMC)

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

ECOLE DOCTORALE :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUÉ

PÔLE : IMMUNOLOGIE ET BIOTHERAPIES

DISCIPLINE : IMMUNOLOGIE

ANNÉES 2012 – 2015 SÉRIE DOCTORAT N° 2015SACLS017

THÈSE DE DOCTORAT

soutenue le 05/10/2015

par

Aude DESNOYER

Etude de l'impact clinique et immunologique d'un traitement par lénalidomide dans la maladie de Kaposi liée au VIH

Directeur de thèse :	Valérie MARTINEZ-POURCHER	MCU-PH (INSERM U996, UPMC)
Co-directeur de thèse :	Karl BALABANIAN	CR1 (INSERM U996, Univ. Paris-Sud)

Composition du jury :

Président du jury :	Olivier LAMBOTTE	PU-PH (INSERM U1184, Univ. Paris-Sud)
Rapporteurs :	Vincent CALVEZ	PU-PH (INSERM U1136, UPMC)
	Jean-Daniel LELIEVRE	PU-PH (INSERM U955, Univ. Paris 12)
Examinateurs :	Françoise BACHELERIE	DR1 (INSERM U996, Univ. Paris-Sud)
	Eric CAUMES	PU-PH (INSERM U1136, UPMC)

A ma famille, qui par sa présence, son soutien et son amour a toujours œuvré à ma réussite et mon bonheur

Etude de l'impact clinique et immunologique d'un traitement par lénalidomide dans la maladie de Kaposi liée au VIH

Remerciements

A Monsieur le Professeur Olivier Lambotte,

Vous m'accordez le privilège de présider le jury de ma soutenance de thèse. Puisse ce travail vous témoigner ma parfaite gratitude et de mon profond respect.

A Messieurs les Professeurs Vincent Calvez et Jean-Daniel Lelièvre,

Vous m'avez fait l'honneur de juger ce travail en qualité de rapporteurs. Soyez assurés de toute mon estime et de ma reconnaissance.

A Madame le Dr Françoise Bachelerie et Monsieur le Professeur Eric Caumes,

Vous avez accepté de participer au jury de soutenance de ma thèse. Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère considération.

A Madame le Docteur Valérie Martinez-Pourcher,

Tu m'encadres et me suis depuis mon master 2, à travers mes projets de recherches fondamentales et cliniques. Merci pour tes conseils, ton soutien et l'aide que tu m'apportes dans ces travaux et au-delà. Je vais maintenant tracer ma route, forte de tout ce que tu m'as appris. Reçois ici toute ma gratitude et mon amitié.

A Monsieur le Docteur Karl Balabanian

J'ai débuté à tes cotés en immunologie. Je t'adresse tous mes remerciements pour le temps que tu m'as consacré, les compétences et le savoir que tu as mis à ma disposition et la rigueur que tu m'as insufflée. Tout en respectant le pharmacien que je suis, tu as su me transmettre le gout de la recherche. J'espère que ce travail témoignera de ce que tu m'as apporté.

A Monsieur de Docteur Gilles Peytavin

Tu as accepté de me recevoir à nouveau dans ton laboratoire, pour cette dernière année de thèse, en m'offrant les meilleures conditions pour travailler et progresser dans mon domaine. Je te remercie pour tes conseils et ton implication tout au long de mon internat. Ils m'ont permis de trouver ma voie et d'avancer dans ce sens. Reçois ici toute mon estime et ma sincère reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Nicolas Dupin, Mesdames les Docteurs Agnès Carlotti, Claire Deback et Anne-Geneviève Marcellin et Monsieur le Docteur Lambert Assoumou,

Merci pour votre disponibilité, l'accès à vos connaissances et à vos patients et la qualité de nos échanges scientifiques.

A Alex, Christelle et Françoise,

J'ai partagé avec vous mes premiers pas dans la recherche et quatre années pleines de joies. Merci pour ces excellents moments passés à vos côtés, tantôt sérieux et scientifiques, tantôt légers et pleins d'humour. Je vous souhaite à tous les trois, un avenir plein de bonheur et de réussite, ce qui ne manquera pas j'en suis sure avec Alex en super post-doc, Christelle brillante doctorante et Françoise, ingénieur et femme d'affaire accomplie.

A toute l'équipe 4, passée et présente, à Marion, Laurence, Nagham, Julie, Jessica, Patrice, Laetitia, Vincent. A Ali,

Merci pour ces 2, 3, 4 années à vos côtés, pour vos conseils, votre bienveillance, votre bonne humeur à toute épreuve. Plein de bonnes choses à vous pour la suite.

A toute l'équipe du laboratoire de pharmaco-toxicologie clinique de l'hôpital Bichat. Patrick, Maryamou, Karima, Patrice, Kim, Jean-Baptiste, Laurent et tous les autres, merci pour votre accueil, vos conseils et les bons moments partagés avec vous.

A toute l'unité INSERM UMR_S996 et ses proches, tout particulièrement à Odile Boulin, Marc Pallardy, Sylvie Chollet-Martin, Hélène Gary et Marie-Laure Aknin, merci de m'avoir chaleureusement accueillie et d'avoir facilité le bon déroulement de ma thèse. Un très grand merci à tous pour vos conseils et aides.

A mes co-thésards et amis de l'INSERM, Mehdi, Joseph, Floriane, Gladys, Pasquale, Lorélie et tous ceux déjà cités, merci d'avoir été présents pendant ces 4 années et d'avoir partagé avec moi les joies et les vicissitudes du doctorat.

A Fanny, Caroline, Mélanie, Swanny, Céline et Hélène. Que vous dire, à part merci pour tout ! Ce travail n'aurait pas la même saveur, si je ne vous avais pas pour partager tous mes autres moments. Quelle chance de vous avoir à mes cotés !

A Lino, le plus beau !

A Antoine, merci pour ton aide et ton soutien dans ce travail, la dernière ligne droite a été intense, mais tu as su la rendre plus douce.

A ma famille, mes grands-mères, mes oncles et tantes, mes cousins et cousines. Je vous dédie ce travail, auquel je ne serais pas parvenue sans vous. Merci de m'avoir entourée depuis toujours de votre bienveillance, votre présence et vos encouragements. Le gout de travailler dans le domaine de la santé ne m'est pas venu par hasard et être une Desnoyer-Marty se mérite. J'espère en être à la hauteur.

A mon grand-père, que j'aurais aimé voir dans l'assemblée en ce jour de soutenance…

A mes parents,

Il semblerait que je puisse enfin voler de mes propres ailes. Certes j'ai quitté le nid comme convenu à 24 ans, mais c'était sans compter les multiples années d'internat qui ont suivi. Eternelle étudiante ? Il faut finalement croire que non ! J'ai pris du temps, mais j'espère que vous serez fiers du résultat. Merci d'avoir su me donner confiance en moi, je vous dois tout…

A mon frère,

Une deuxième thèse, pour que tu puisses être présent à ton retour de RIO… Je crois que tout est dit ! En espérant que tu seras fier de ta sœur, comme je suis fière et heureuse de t'avoir à mes côtés…

Abréviations

AA : acides aminés

ABV : adriamycine (doxorubicine), bléomycine et vincristine

ABVD : doxorubicine, bléomycine, vinblastine, dacarbazine

Ac : anticorps

ACTG : *AIDS Clinical Trials Group*

ANRS : Agence Nationale de Recherche sur le SIDA et les hépatites

ARV : antirétroviraux

BC : biopsie cutanée

BCBL : *body cavity-based lymphoma*

bFGF : *basic Fibroblast Growth Factor*

BJAB : lignée cellulaire B de lymphome de Burkitt

BMS-275291 : rebimastat

CD : clusters de différenciation

CDC : *Center for Diseases Control*

CHOP : doxorubicine, cyclophosphamide, vincristine et prednisolone

CMH I : complexe majeur d'histocompatibilité de classe I

CMSP : cellules mononuclées du sang périphérique

COL-3 : metastat

CV : charge virale

CYP : cytochromes P450

DMVEC : *Dermal Microvascular Endothelial Cells*

EBV : virus Epstein-Barr

Et coll. : et collaborateurs

FHDH ANRS CO4 : base de données hospitalière française sur l'infection par le VIH de l'ANRS

GM-CSF : *Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*

HDMEC : *Human Dermal Microvascular Endothelial Cells*

HeLa : lignée cellulaire provenant de métastase d'un cancer du col de l'utérus

HHV-8 : virus de l'Herpès humain 8

HIF-1α : *Hypoxia Inductible Factor -1α*

HPV : Papillomavirus humain

HSH : hommes ayant des rapports sexuels avec des hommes

HSV-2 : Herpès Simplex Virus 2

HTLV-1 : Virus T-Lymphotropique Humain de type 1

HUVEC : Human Umbilical Vein Endothelial Cells

IEC : inhibiteurs de l'enzyme de conversion

IF : immunofluorescence

IFN-α : interféron α

IHC : immunohistochimie

IL- : Interleukine

IL-6-Ra : CD126 : sous-unité alpha du récepteur à l'IL-6

IL-6-Rb : gp130 : sous-unité béta du récepteur à l'IL-6

INI : inhibiteur de l'intégrase

INNTI : inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse

INSERM : Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale

INTI : inhibiteur nuléosidique de la transcriptase inverse

IP : inhibiteur de la protéase

IP/r : inhibiteur de protéase potentialisé par le ritonavir

IRIS : *Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome*, syndrome de reconstitution immunitaire

JX: jour X

KCP : *KSHV Complement Control Protein*

KS 38 : lignée cellulaire dérivée d'une biopsie cutanée de lésions de MK-VIH

KSHV : *Kaposi Sarcoma Herpes-Virus*

LANA : *Latency-Associated Nuclear Antigen*

miARN : micro Acide Ribonucléique

MIR1 : *Modulator of Immune Recognition-1*, protéines K3

MIR2 : *Modulator of Immune Recognition-2*, protéine virale K5

MK : maladie de Kaposi

MK-classique : maladie de Kaposi classique

MK-endémique : maladie de Kaposi endémique

MK-iatrogène: maladie de Kaposi iatrogène

MK-VIH : maladie de Kaposi épidémique

MMP : métalloprotéases matricielles

MOPP : chlormethine, vincristine, procarbazine, prednisone

mTOR : *mammalian Target Of Rapamycin*

NCI : *National Cancer Institute*

NIH : *National Institutes of Health*

NIH 3T3 : lignées cellulaires dérivées de fibroblastes embryonnaires de souris

NK: cellule *Natural killer*

NKT : cellule *Natural Killer* Tueuse

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OR : odds ratio

PBS : tampon phosphate salin

PD1 : *Programmed Death receptor-1*

PD-L1 *: Programmed cell Death Ligand 1*

PGA: *Physical Global Assessment*
Pgp : glycoprotéine P
post-ARV : période après mise à disposition des ARV
pré-ARV : période avant mise à disposition des ARV
RCPG : récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G
RT : régions terminales répétées
RTA : *Reactivation Transcriptional Activator*
SC : *spindle cells*
SDF-1 : CXCL12 : *Stromal cell-Derived Factor 1*
sirolimus : rapamycine
SU5416 : semaxinib
SX : semaine X
TEP scan : tomographie par émission de positons
TGF-β : Tumor Growth Factor-β
Th : lymphocyte T helper
TLR : *Toll-Like* récepteurs
TNF-α : *Tumor Necrosis Factor α*
Tr1 : lymphocyte T régulateur induit
Treg : lymphocyte T régulateur
UDIV : utilisateurs de drogues par voie intraveineuse
UPLC-MS/MS : chromatographie liquide ultra haute performance couplée à la spectrométrie de masse
VEGF : *Vascular Endothelial Growth Factor*
VEGFR-1 et -2 : récepteur 1 et 2 du VEGF
VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine
VIH-1 : VIH de type 1
VIH sans MK : patient infecté par le VIH exempt de MK
vIL-6 : Interleukine 6 virale
vIRF1-4 : facteurs viraux de régulation de l'IFN
vRCPG : Récepteur viral à 7 domaines transmembranaires couplé aux protéines G
μM : micromole par litre
293T : lignée cellulaire dérivée de cellules embryonnaires rénales humaines

Table des matières

Avant-propos **21**

Introduction **25**

1) La maladie de Kaposi : Epidémiologie et Sémiologie **27**

A. Histoire de la maladie 27

B. Formes cliniques de la maladie 29

1) La forme classique (MK-classique) 29

2) La forme endémique (MK-endémique) 29

3) La forme iatrogène (MK-iatrogène) 29

4) La forme épidémique (MK-VIH) 29

C. Epidémiologie de la maladie de Kaposi 30

1) Séroprévalence du virus HHV-8 30

2) Facteurs de risque de transmission d'HHV-8 32

3) Modes de transmission d'HHV-8 32

4) Incidence et évolution de la maladie de Kaposi 34

D. Présentation clinique et histologique de la maladie de Kaposi 36

2) La maladie de Kaposi : Physiopathologie **38**

A. Rôle de l'Herpès Virus Humain de type 8 38

1) Généralités 38

2) Cycle viral d'HHV-8 39

3) Stratégies d'échappement d'HHV-8 au système immunitaire 40

4) Processus physiopathologiques induits par HHV-8 44

5) Propriétés de la protéine LANA 45

B. Rôle des cofacteurs 47

1) Immunosuppression et activation immunitaire 47

2) Facteurs environnementaux 48

3) Facteurs génétiques 49

C. Rôle des cytokines, chimiokines et facteurs de croissance 50

1) Cytokines et facteurs de croissance du microenvironnement 51

2) Cytokines et chimiokines produites par HHV-8 52

D. Rôle du trio CXCL12/CXCR4-CXCR7 53

1) Activités physiologiques du trio 53

a. CXCL12 53

b. CXCR4 55

c. CXCR7 56

2) Propriétés oncogéniques 58

a. CXCL12 58

b. CXCR4 60

c. CXCR7 63
3) Implication dans la maladie de Kaposi 66
a. CXCL12 66
b. CXCR4 67
c. CXCR7 70
3) La maladie de Kaposi liée au VIH 71
A. Epidémiologie 71
1) Séroprévalence du virus HHV-8 chez les patients infectés par le VIH 72
2) Facteurs de risque et modes de transmission d'HHV-8 73
3) Incidence de la maladie de Kaposi liée au VIH 73
B. Rôle du VIH 75
C. Prise en charge thérapeutique 77
1) Stratégie thérapeutique actuelle 77
a. Les antirétroviraux 77
b. Traitements locaux 79
c. Traitements généraux 80
L'immunothérapie 80
Les chimiothérapies 81
Interactions médicamenteuses entre traitements généraux et ARV 83
2) Nouvelles stratégies thérapeutiques 84
a. Traitements ciblant le virus HHV-8 85
b. Traitements ciblant l'angiogenèse 85
c. Traitements immunomodulateurs 86
Les inhibiteurs du mTOR 86
L'IL-12 87
Les inhibiteurs de tyrosine kinase 87
d. Traitements par un dérivé du thalidomide : le lénalidomide 88
Généralités 88
Mécanisme d'action 89
Données dans la maladie de Kaposi 92
Interactions médicamenteuses avec les ARV 92
Objectifs des travaux 95
Matériels et Méthodes 99
1) Patients 101
2) Essai clinique 104
A. Plan de l'étude 104
B. Critères d'inclusion et d'exclusion 104
C. Traitement de l'étude 105
D. Suivi des patients 106

E. Evaluation 107
3) Méthodes 108
A. Immunohistochimie et immunofluorescence 108
B. Quantification protéique 109
C. Dosages des cytokines plasmatiques 110
D. Dosages des ARV et du lénalidomide 111
E. Analyses statistiques 111
Résultats 113
1) Impact d'un traitement par lénalidomide sur l'évolution de la maladie de Kaposi chez des patients infectés par le VIH : ANRS 154 Lenakap 115
A. Rationnel 115
B. Article 1 : Exposé des travaux 119
C. Résultats et conclusion 153
2) Le trio CXCL12/CXCR4-CXCR7 : biomarqueur de la maladie de Kaposi liée au VIH ? 156
A. Rationnel 156
B. Article 2 : Exposé des travaux 159
C. Résultats et conclusion 193
Discussion et Perspectives 197
1) Impact d'un traitement par lénalidomide dans la MK-VIH 199
A. Réponse et tolérance des patients atteints de MK-VIH au lénalidomide 199
1) Un réponse clinique faible 199
2) Le choix de la dose était-il optimal ? 200
3) Une bonne tolérance au lénalidomide dans la MK-VIH 200
4) Pas d'interaction entre le lénalidomide et les ARV 201
B. Comment évaluer la réponse au traitement dans la MK ? 202
C. Perspectives pour les dérivés du thalidomide dans la MK 203
2) Nouvelles données dans la physiopathologie de la MK 205
A. CXCL12/CXCR4-CXCR7 biomarqueurs histologiques de la MK 205
1) CXCL12/CXCR4-CXCR7, un trio impliqué dans la physiopathologie de la MK 206
2) CXCL12/CXCR4-CXCR7 biomarqueurs histologiques de la MK 206
3) CXCL12 n'est pas un biomarqueur plasmatique de la MK ? 209
4) Une signature cytokinique spécifique de la MK-VIH 210
Références bibliographiques 213
Annexes 237
1) Article 3 239
2) Article 4 251
3) *Curriculum Vitae* 267

Table des figures

Figure 1 : Maladie de Kaposi : une néoplasie multifactorielle 28
Figure 2 : Séroprévalence d'HHV-8 au niveau mondial 31
Figure 3 : Incidence de la MK au niveau mondial 34
Figure 4 : Manifestations cutanées, muqueuses et viscérales de la MK 36
Figure 5 : Présentation histologique des lésions de MK 37
Figure 6 : Génome du virus HHV-8 sous forme épisomale 39
Figure 7 : Mécanismes d'échappement au système immunitaire mis en place par HHV-8 43
Figure 8 : Structure et domaines fonctionnels de la protéine LANA 46
Figure 9 : Rôles des cytokines, chimiokines et facteurs de croissance dans la pathogénie de la MK-VIH 53
Figure 10 : Structure du récepteur CXCR4 55
Figure 11 : Voies de signalisation et rôles physiologiques de CXCR4 56
Figure 12 : Voies de signalisation et rôles physiologiques de CXCR7 57
Figure 13 : Implication en cancérologie de l'axe CXCL12/CXCR4-CXCR7 65
Figure 14 : Détection constitutive de CXCL12 dans la peau 66
Figure 15 : Détection de CXCL12 dans une biopsie cutanée de MK 67
Figure 16 : Expression de *CXCR4* dans six biopsies cutanées de MK 68
Figure 17 : Détection de CXCR4 sur six biopsies cutanées de MK 68
Figure 18 : Détection de CXCR4 dans une biopsie cutanée de MK 69
Figure 19 : Expression de *CXCR4* diminuée par HHV-8 *in vitro* 69
Figure 20 : Pouvoir transformant de *CXCR7* et surexpression dans 2 biopsies cutanées de MK-VIH 71
Figure 21 : Distribution des cas de cancers en fonction du site et du statut VIH, en Côte d'Ivoire et au Bénin 74
Figure 22 : Ratio standardisé d'incidence de la MK chez les patients infectés par le VIH et dans la population générale, par période calendaire 75
Figure 23 : Structures chimiques des IMIDs 89
Figure 24 : Effets pléïotropes du lénalidomide 91
Figure 25 : Lésion d'angiome cutané 103

Table des tableaux

Tableau 1 : Différentes formes de MK 30
Tableau 2 : Protéines codées et induites par le virus HHV-8, impliquées dans la physiopathologie de la MK 41
Tableau 3 : Expression et rôles *in vivo* des cytokines, chimiokines et facteurs de croissance impliqués dans la MK : 52
Tableau 4 : Nomenclature et fonctions régulatrices clefs des protéines du trio CXCL12/CXCR4-CXCR7 58
Tableau 5 : Expression de CXCR4 dans différents cancers 61
Tableau 6 : Impact de CXCR7 dans différents cancers 64
Tableau 7 : Efficacité et effets indésirables des principales monochimiothérapies utilisées dans la prise en charge de la MK 82
Tableau 8 : Efficacité des principales polychimiothérapies utilisées dans la prise en charge de la MK 82
Tableau 9 : Calendrier de l'essai clinique ANRS 154 Lenakap 102
Tableau 10 : Données démographiques des patients inclus dans ce travail 103
Tableau 11 : Concordances scores PGA et ACTG 107
Tableau 12 : Anticorps et conditions utilisées en immunohistochimie et immunofluorescence 109

Avant-propos

«Rien ne sert de courir, il faut partir à point»

Jean de la Fontaine

La maladie de Kaposi (MK) est une tumeur cutanée, associée à la présence du virus de l'Herpès humain 8 (HHV-8). Cette maladie opportuniste est le second cancer rapporté au cours du déficit immunitaire induit par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (1). Cette pathologie multifactorielle se développe en présence du virus HHV-8 et d'un microenvironnement pro-inflammatoire riche en cytokines et facteurs de croissance, dans un contexte d'immunosuppression (2).

L'apparition des associations antirétrovirales (ARV) a profondément modifié l'histoire naturelle et le pronostic de cette maladie. Cependant, il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement curatif. La prise en charge thérapeutique repose essentiellement sur des traitements locaux à visée cosmétique ou des traitements généraux par chimiothérapies ou interféron α (IFN-α). La compréhension récente de certains mécanismes physiopathologiques de la MK a ouvert de nouvelles perspectives thérapeutiques, actuellement à l'étude.

Le lénalidomide constitue l'une d'entre elles. Ce dérivé du thalidomide, aux effets immunomodulateurs pléïotropes, cible différentes anomalies rencontrées dans la MK (3).

Dans le cadre de l'essai clinique ANRS 154 Lenakap (www.clinicaltrials.gov, NCT01282047), des patients atteints d'une MK associée à l'infection par le VIH (MK-VIH), contrôlés sur le plan immunovirologique (taux de lymphocytes T CD4>300/mm^3 et charge virale (CV) VIH indétectable), traités efficacement par ARV depuis plus de 6 mois et n'ayant pas répondu à une ou plusieurs lignes de chimiothérapies antérieures, ont été inclus afin d'évaluer l'efficacité et la tolérance du lénalidomide dans cette indication.

Le but de ce travail a été d'étudier l'impact clinique et immunologique d'un traitement par lénalidomide dans la MK-VIH, tout comme, pour la première fois, les interactions médicamenteuses potentielles entre le lénalidomide et les ARV. L'accès aux prélèvements plasmatiques et cutanés collectés au cours de cette étude a permis d'approfondir les connaissances générales de la physiopathologie de la MK, notamment relatives à l'expression des cytokines, chimiokines et facteurs de croissance. Il a notamment été mis en évidence le rôle de biomarqueur histologique des protéines du trio de chimiokine et récepteurs CXCL12/CXCR4-CXCR7 dans la MK.

Introduction

« La nature ne fait rien sans objet »

Aristote

1) La maladie de Kaposi : Epidémiologie et Sémiologie

A. Histoire de la maladie

La MK a été décrite pour la première fois en 1872 par le dermatologue hongrois, Moritz Kaposi. Ce dernier avait alors rapporté les cas de 5 hommes, âgés de 40 à 68 ans, présentant de « multiples sarcomes cutanés, idiopathiques et pigmentés » (4). Ces lésions rouges, brunes ou bleutées, de taille variable, observées initialement aux chevilles puis aux avant-bras, étaient également retrouvées en post-mortem au niveau de la trachée, de l'œsophage, de l'estomac, du foie et de l'intestin des patients (Photo 1).

Photo 1 : Lésions de Kaposi chez un patient âgé de 68 ans
(Moulage de Jules Baretta, Collection Musée des moulages de l'Hôpital Saint-Louis (AP-HP), [Vidal 1877]). Poignet et main gauche, face dorsale, avant-bras et poignet gauche, bord interne. Collection générale n° 470, vitrine 78 : Sarcomatose généralisée. http://www.biusante.parisdescartes.fr/histmed/image?STLCGE00470.

Au niveau histologique, M. Kaposi décrivait dans 2 lésions nodulaires, la présence de petites cellules sarcomateuses en masse et en bouquets accompagnées de zones hémorragiques (5).

Aucun traitement, incluant l'arsenic par voie orale ou en injection, n'était efficace et l'exérèse chirurgicale n'empêchait pas la réapparition de nouvelles lésions. La majorité des patients diagnostiqués à cette époque décédaient dans les 5 ans suivant l'apparition des symptômes.

L'épidémie a d'abord été décrite comme une tumeur rare touchant les hommes âgés d'Europe et d'Amérique, mais représentant jusqu'à 9% des cancers en Afrique équatoriale (4). Dans les années 1980, des médecins américains ont constaté une épidémie de MK chez

des jeunes hommes homosexuels (6, 7), premier indicateur de l'apparition de l'épidémie de VIH/SIDA (8).

Depuis l'arrivée des trithérapies hautement actives, l'incidence de ce cancer a considérablement diminué mais reste malgré tout l'une des tumeurs les plus fréquentes chez les patients infectés par le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) (9).

L'origine multifactorielle de cette tumeur vasculaire, se manifestant le plus souvent par des lésions cutanées indépendantes, est désormais acquise. Elle repose notamment sur la présence d'un herpès virus appelé Human Herpes-Virus 8 (HHV-8) ou Kaposi Sarcoma Herpes-Virus (KSHV), découvert en 1994, associé à un microenvironnement pro-inflammatoire riche en cytokines, chimiokines et facteurs de croissance et à un état d'immunodépression (Figure 1) (2, 10).

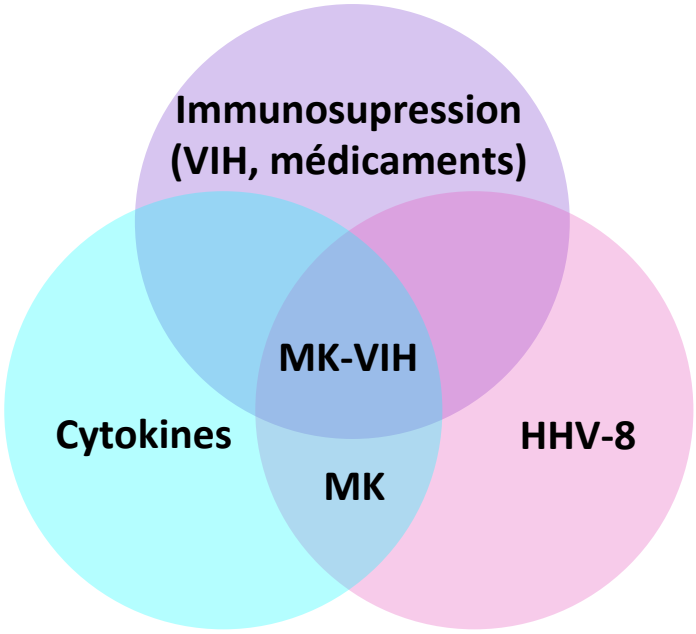


Figure 1 : Maladie de Kaposi : une néoplasie multifactorielle
(Modifiée d'après Hengge et coll., Lancet Infect Dis, 2002). Plusieurs composantes imbriquées sont nécessaires au développement de la maladie de Kaposi. Elle repose notamment sur une triade : infection virale par HHV-8, présence d'un microenvironnement inflammatoire comportant notamment des cytokines et présence d'une immunosuppression. MK : maladie de Kaposi, VIH : virus de l'immunodéficience humaine, MK-VIH : MK associée à l'infection par le VIH, HHV-8 : Human Herpes-Virus 8.

Bien que l'implication des cytokines et facteurs de croissance dans cette pathologie soit connue, peu de données sont disponibles concernant leur profil d'expression et d'évolution selon la progression de la pathologie. Par ailleurs, il n'existe pas à l'heure actuelle de traitement curatif spécifique de la maladie, la prise en charge thérapeutique des patients reposant le plus souvent sur des mesures cosmétiques éventuellement associées à des mono ou polychimiothérapies.

B. **Formes cliniques de la maladie**

On distingue 4 formes épidémiologiques de MK : classique, endémique, iatrogène et épidémique (Tableau 1) (2, 11-13).

1) La forme classique (MK-classique)

Elle touche principalement les sujets âgés de sexe masculin (sexe ratio 10-15 hommes/ 1 femme) du pourtour méditerranéen et de l'Europe de l'Est. Elle se manifeste principalement par une atteinte cutanée au niveau des membres inférieurs, rarement associée à la présence de métastases au niveau d'organes secondaires et présente une évolution lente.

2) La forme endémique (MK-endémique)

Décrite en Afrique subsaharienne, cette forme se rencontre principalement chez l'adulte de sexe masculin (sexe ratio 3 hommes/ 1 femme), mais peut également toucher les enfants. On distingue différents modes d'évolution, allant de la forme cutanée bénigne chez les jeunes adultes, à la forme agressive pouvant envahir les tissus mous et les viscères, habituellement mortelle dans les 5 à 7 ans, voire la forme fulminante diffusant rapidement vers les ganglions lymphatiques et les viscères, souvent en l'absence de lésion cutanée et touchant plus fréquemment les jeunes enfants.

3) La forme iatrogène (MK-iatrogène)

Elle survient chez des patients recevant des traitements immunosuppresseurs au long cours, notamment dans le cadre de transplantations d'organes. Bien que l'évolution puisse être rapide, la rémission spontanée en cas de modification, d'arrêt, d'allégement ou de modification du traitement immunosuppresseur est le plus souvent observée.

4) La forme épidémique (MK-VIH)

Cette dernière forme est associée au déficit immunitaire induit par le VIH. Elle touche en majorité les hommes (sexe ratio 50 hommes/ 1 femme), avec une incidence maximale dans la population homosexuelle. Cette forme est généralement plus agressive, avec des atteintes cutanées et muqueuses diffuses, des localisations viscérales assez fréquentes pouvant être responsables de décès, malgré des traitements spécifiques.

Tableau 1 : Différentes formes de MK

Formes	Classique	Endémique	Iatrogène	Épidémique
Géographie	Pourtour méditerranéen	Afrique Centrale et de l'Est	Pays riches	Mondiale
Population à risque	Hommes âgés (10 H/1 F)	Enfants et adultes (2-3 H/1 F)	Patients recevant des immunosuppresseurs	Hommes homo/bisexuels infectés par le VIH (50 H/1 F)
Atteinte cutanée	Papules et nodules fréquents	Nodules ulcérés fréquents Forme ganglionnaire	Atteinte cutanée variable	Macules, papules, nodules, atteintes cutanées diffuses
Atteinte muqueuse	Rare	Rare	Plus fréquente	Fréquente
Atteinte viscérale	Rare	Possible	Possible	Fréquente (digestive, pulmonaire++)
Évolution	Lente	variable	Localisée	Rapide
Pronostic	Survie 10-15 ans	Survie 1-10 ans	Amélioration si adaptation thérapeutique	2 ans sans traitement antirétroviral

H : Homme, F : Femme, VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine.

C. Epidémiologie de la maladie de Kaposi

1) Séroprévalence du virus HHV-8

L'épidémiologie de la MK est étroitement corrélée à la séroprévalence du virus HHV-8. Cette dernière se révèle très hétérogène en fonction des régions du globe et des populations. Alors qu'elle est généralement inférieure à 5% dans la population adulte des pays d'Europe du Nord, aux États-Unis, ou en Amérique du Sud, le pourtour méditerranéen constitue une zone de séroprévalence intermédiaire avec 10 à 20% de la population touchée et l'Afrique une zone de séroprévalence élevée variant de 20 à 80% de la population générale (Figure 2) (8, 14-19).

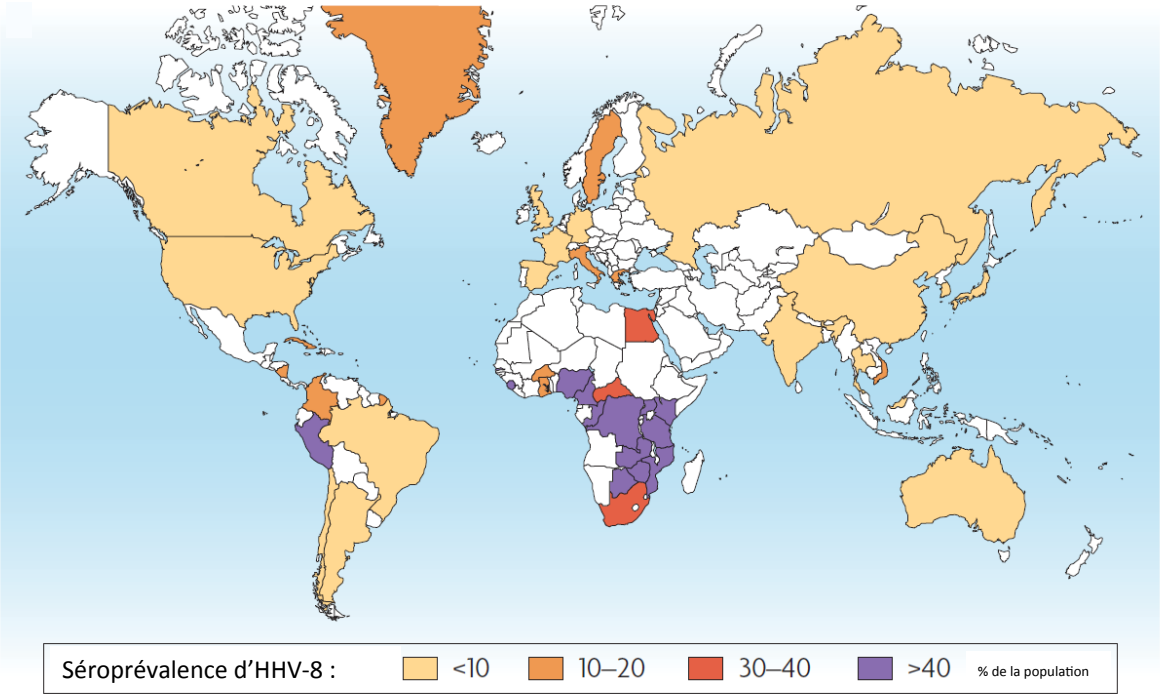


Figure 2 : Séroprévalence d'HHV-8 au niveau mondial
(Modifiée d'après Mesri et coll., Nature Review, 2010). Séroprévalence du virus HHV-8 dans la population générale de différents pays (donneurs de sang le plus souvent), les cohortes de patients infectés par le VIH sont exclues. Ces données sont issues de multiples études, quand plusieurs taux étaient retrouvés pour un même pays, la valeur moyenne a été reportée sur le graphique. En Europe du Nord, Asie et Etats-Unis moins de 10% de la population générale présente des anticorps anti-HHV8, contre plus de 50% en Afrique subsaharienne. Le pourtour méditerranéen constitue une zone intermédiaire avec une séroprévalence comprise entre 10 et 30% de la population.

Ces différences se retrouvent dès l'enfance, puisque dans les zones endémiques, telles que le Nigéria ou l'Ouganda, 14 à plus de 30% des enfants présentent des anticorps anti-HHV-8 contre 4 à 6 % des enfants en zones non endémiques, telles que les Etats-Unis ou l'Allemagne (20-22). Des disparités existent également au sein de ces régions. Il a notamment été mis en évidence des séroprévalences élevées chez les amérindiens du Brésil ou d'Equateur alors que moins de 4% de la population générale de ces pays présentent des anticorps anti-HHV-8 (14). En Italie, les mêmes observations ont été faites par Whitby et coll., et rapportaient 24,6% de séroprévalence dans une population de donneurs de sang résidant en Italie du Sud, contre moins de 7,5 % des italiens du Nord ou du Centre (P<0,001) (17). Ces mêmes disparités sont retrouvées chez les migrants africains d'Europe (23), les patients VIH (32 à 60%) (24) ou encore les hommes ayant des rapports sexuels avec des hommes (HSH) qu'ils soient ou non infectés par le VIH. En France, par exemple, il a été rapporté que 24% des HSH caucasiens se rendant dans un centre de dépistage des infections sexuellement transmissibles étaient infectés par HHV-8, contre 4% des hétérosexuels de la même origine ethnique (25). Des résultats similaires ont été observés aux Etats-Unis avec 25% des HSH

infectés par HHV-8 ou en Suisse, avec 20% des HSH, contre 7% des hommes hétérosexuels non infectés par le VIH et 5% des donneurs de sang (19, 26, 27). Cependant, l'incidence globale est peut-être sous-estimée. En effet, les titres sériques en anticorps anti-HHV-8 sont corrélés à la charge virale HHV-8. Or, les charges virales HHV-8 sont souvent faibles ou indétectables. Il est donc possible que les titres en anticorps bas ne soient pas détectés pas certaines techniques de titration (11). Quoi qu'il en soit, les contrastes de séroprévalence observées à travers le monde et les sous-populations touchées suggèrent de multiples facteurs de risque et modes de transmission d'HHV-8.

2) Facteurs de risque de transmission d'HHV-8

Parmi les facteurs de risque de transmission du virus HHV-8 figure l'âge avancé, la vie en milieu rural, le sexe masculin, l'absence de circoncision ou encore les conditions socio-économiques faibles (28-30).

Chez les enfants, il a été montré dans des zones endémiques que la présence d'anticorps anti-HHV-8 chez la mère ou encore l'infection par le VIH ou le paludisme étaient associés une séropositivité HHV-8 plus élevée (31). Dans les zones non endémiques telles que les Etats-Unis, l'asthme et les allergies aux pollens ont également été proposés comme facteurs de risque (32). Quelle que soit la région, il semble que les statuts socio-économiques faibles soient reliés à une séroprévalence plus élevée.

Chez l'adulte, bien que le sexe féminin ou masculin ne semble pas avoir d'impact sur la séroprévalence, un nombre élevé de partenaires sexuels, ou encore la présence d'infections sexuellement transmissibles telles que l'infection par le virus de l'hépatite B, de l'Herpès Simplex Virus 2 (HSV-2), la syphilis et les urétrites soient des facteurs de risque de transmission chez les HSH (29, 33-36). Ces facteurs de risques ne se retrouvent pas chez les femmes, ni chez les hommes hétérosexuels (33, 37). Parmi les pratiques sexuelles à risque chez les HSH, il semble que la fellation, les rapports anaux réceptifs, l'utilisation d'amphétamines ou de poppers ou encore les baisers profonds soient à risque d'infection (36).

3) Modes de transmission d'HHV-8

Ces résultats suggèrent également des modes de transmission d'HHV-8 variés, éventuellement différents en fonction des zones géographiques. Le génome viral peut être retrouvé dans la salive, la muqueuse oro-pharyngée, les cellules mononuclées du sang périphérique (CMSP), les sécrétions cervico-vaginales, le sperme ou encore la prostate, constituant des sources de transmission à la fois non sexuelles et sexuelles multiples (8).

Dans les régions et populations endémiques, d'Afrique subsaharienne ou amérindiennes, la forte séroprévalence infantile et ce, même avant l'âge d'un an, suggère une transmission verticale périnatale, via les sécrétions cevico-vaginales au moment de l'accouchement, ou via le lait maternel (38-41). Ces voies semblent malgré tout accessoires et la transmission via le lait reste controversée (8, 42). Dans les zones endémiques, la proportion d'enfants séropositifs pour HHV-8 semble en faveur de l'existence d'au moins un autre mode de contamination pendant l'enfance. En effet, il a été rapporté qu'à 2 ans 7 à 10% des enfants étaient infectés et qu'à 8 ans plus de 30% d'entre eux présentaient des anticorps anti-HHV-8 (43). La transmission horizontale via la salive semble représenter la voie principale de transmission infantile, notamment dans ces zones (42, 44, 45). En effet, le virus HHV-8 est fréquemment retrouvé dans la salive des patients infectés et il est sécrété de façon intermittente, répétée et en grande quantité par ces derniers (44-46).

La transmission via les dons de sang représente une autre voie de transmission horizontale, non sexuelle potentielle (47-50). Hladik et coll. ont par exemple montré dans une étude menée en Ouganda, que la transfusion sanguine provenant de donneurs HHV-8 positifs entrainait un sur-risque de contamination de 2,8% pour les patients. Ce risque était d'autant plus important que les prélèvements étaient conservés peu de temps (moins de 4 jours) (51). Dans une seconde étude, cette même équipe rapportait que les transfusions sanguines issues de donneurs HHV-8 positifs conservées moins de 4 jours entrainaient une surmortalité des receveurs par rapport à celle de donneurs HHV-8 négatifs (odds ratio (OR) : 1,92) (52).

Chez l'adulte, il semble que la transmission sexuelle soit la principale voie de contamination, à la fois dans la population hétérosexuelle et chez les HSH (29, 35, 53). Les données obtenues chez les hétérosexuels restent malgré tout controversées. Des études menées en Afrique, ont montré des séroprévalences élevées chez des travailleuses du sexe (31 à 44 %), supérieures à celles retrouvées dans un groupe de référence à faible risque de transmission du VIH (19%), confirmant une possible transmission hétérosexuelle (54, 55). Au contraire, une autre étude menée en Afrique du Sud ne rapportait pas d'augmentation de la séroprévalence dans les groupes à risque de transmission sexuelle par rapport aux groupes à faible risque (56). La contamination via la salive échangée au cours des rapports sexuels pourrait également expliquer la transmission dans ces populations (8). Cependant cette hypothèse n'explique pas la plus forte séroprévalence d'HHV-8 dans les populations HSH par rapport aux populations hétérosexuelles (19, 26, 35).

4) Incidence et évolution de la maladie de Kaposi

A quelques singularités près, il existe une forte corrélation entre la séroprévalence d'HHV-8 et l'incidence de la MK (Figure 3). Celle-ci est plus élevée dans les pays endémiques, avec néanmoins des exceptions, notamment en Gambie où la prévalence d'HHV-8 est élevée mais la MK rare, suggérant le rôle de cofacteurs environnementaux dans l'apparition de la pathologie (57).

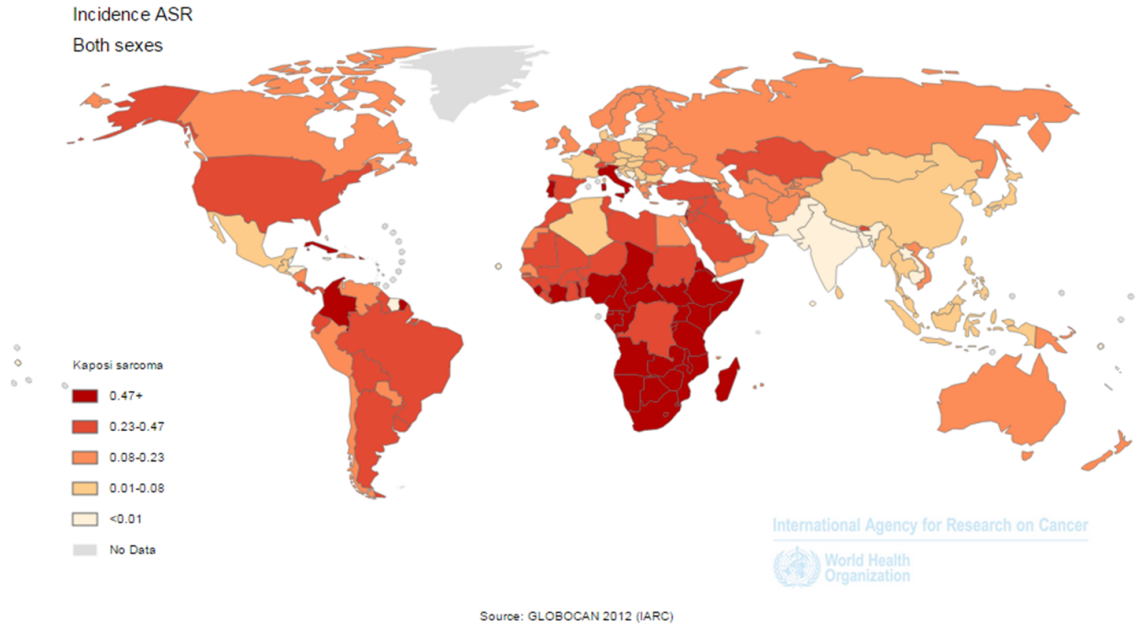


Figure 3 : Incidence de la MK au niveau mondial
(D'après http://globocan.iarc.fr/Pages/Map.aspx, téléchargée le 15/06/2015). L'Amérique, l'Europe et l'Asie constituent des régions de faible incidence de la MK, tandis que l'Afrique subsaharienne présente une incidence élevée et le pourtour méditerranéen une incidence intermédiaire.

En Afrique, la distribution de la MK varie en fonction des régions : plutôt rare en Afrique du Nord, elle constitue le 3ème cancer en terme d'incidence et de mortalité rapportées chez les hommes d'Afrique subsaharienne, représentant jusqu'à 10% des cancers dans certaines zones d'Afrique Centrale ou de l'Est (58). Son incidence et sa mortalité standardisées sur l'âge sont respectivement de 6,8 et 6,2 pour 100 000 hommes, et de 3,7 et 2,9 pour 100 000 femmes en Afrique subsaharienne (7ème cancer rapporté chez ces dernières) (59). En comparaison, avant l'épidémie de VIH/SIDA, cette pathologie était rare dans les pays d'Europe et aux Etats-Unis avec une incidence annuelle de 0,5 pour 100 000 habitants, représentant 0,3% des cancers masculins et 0,1% des cancers féminins (58). D'après le «*Surveillance Epidemiology and End Results Program*», aux Etats-Unis en 2012, l'incidence globale de la MK était de 1,25 pour 100 000 hommes et 0,9 pour 100 000 femmes. Dans les sous-populations, on observait une incidence de 0,9 chez les hommes caucasiens et de 3,66

chez les afro-américains (60). Dans certains états, tels la Californie, New-York, la Géorgie ou le District de Columbia, l'incidence peut être jusqu'à 6 fois plus élevée (11). En Italie également, les taux varient d'une région à l'autre avec une incidence de 0,2 pour 100 000 habitants en Ombrie contre 2,2 dans la province de Brescia (11). Globalement, près de 90% des cas de MK sont observés en Afrique subsaharienne, avec moins de 15% de survie 5 ans après le diagnostic (11).

Dans les pays développés la majorité des nouveaux cas de MK surviennent chez des patients immunodéprimés. En Europe, le projet RARECARE a rapporté en 2014 une incidence standardisée sur l'âge de 0,8 pour 100 000 habitants en Europe du Sud et de moins de 0,3 pour 100 000 dans les autres régions. Cette plus forte incidence au Sud semble à la fois liée aux cas de MK-classiques dans certains pays méditerranéens et à la forme MK-VIH dans des pays où l'incidence du VIH est relativement élevée. La survie relative à 5 ans entre 2000 et 2002 rapportée dans cette étude était de 75% (61). L'incidence de la MK-VIH sera abordée plus spécifiquement dans le chapitre 3).A.3.

La MK-classique présente une incidence maximale chez les hommes du pourtour méditerranéen, entre 60 et 80 ans. Dans des régions à forte prévalence telles que la Sardaigne ou la Sicile, des incidences annuelles respectives de 2,4 et 3,0 pour 100 000 hommes et 0,8 et 0,5 pour 100 000 femmes ont été publiées (62, 63). Deux études plus récentes ont même rapporté des incidences allant jusqu'à 8,8 et 6,2 pour 100 000 hommes de plus de 50 ans dans ces régions et de 2,2 à Malte (18, 64).

La MK-iatrogène est fréquemment retrouvée chez les patients ayant bénéficié d'une greffe d'organe, notamment rénale. L'incidence de la MK suite à une transplantation est 4 à 500 fois plus élevée que dans la population générale (65, 66). Une étude observationnelle prospective iranienne portant sur 21 années, a montré que la MK était la tumeur maligne la plus fréquemment rencontrée en post-transplantation rénale (25%) avec une incidence maximale dans les 2 ans suivant la greffe (82% des patients) (67). L'incidence de la MK-iatrogène chez les patients de cette cohorte était de 1,1%. Encore une fois, des différences géographiques existent dans cette forme de MK. En Europe de l'Ouest et du Nord, l'incidence est de 0,5% des patients greffés, tandis qu'elle atteint 5% dans les pays méditerranéens, allant jusqu'à 15% chez les patients VIH (68). La mortalité de cette forme oscille entre 8 et 14% (69). La réduction de l'immunosuppression ou le changement de molécules immunosuppressives notamment anti-calcineurines (ciclosporine, tacrolimus) par un inhibiteur de la *mammalian Target Of Rapamycin* (mTOR), tels que l'everolimus ou le

sirolimus (rapamycine), permettent dans certains cas une régression voire une disparition des lésions cutanées et/ou viscérales (68-70).

L'ensemble de ces données confirme le caractère multifactoriel de la MK, reposant notamment sur la présence du virus HHV-8. Cependant, le ratio homme/femme, la répartition géographique et la faible prévalence de la MK dans les populations immunocompétentes montrent l'existence de cofacteurs génétiques, environnementaux et immunologiques nécessaires au développement de la maladie.

D. Présentation clinique et histologique de la maladie de Kaposi

Comme nous l'avons vu précédemment, cette pathologie affecte principalement la peau mais peut également toucher les muqueuses, les ganglions et viscères (tube digestif, poumons). Des études réalisées *post mortem* suggèrent que plus de 25% des patients présentent également une atteinte viscérale. Ces manifestations sont à l'origine de défaillances d'organes pouvant engager le pronostic vital (71).

Les atteintes cutanées se manifestent typiquement par des lésions planes, maculeuses, violacées évoluant secondairement vers des papules ou plaques puis des nodules (Figure 4) (2).

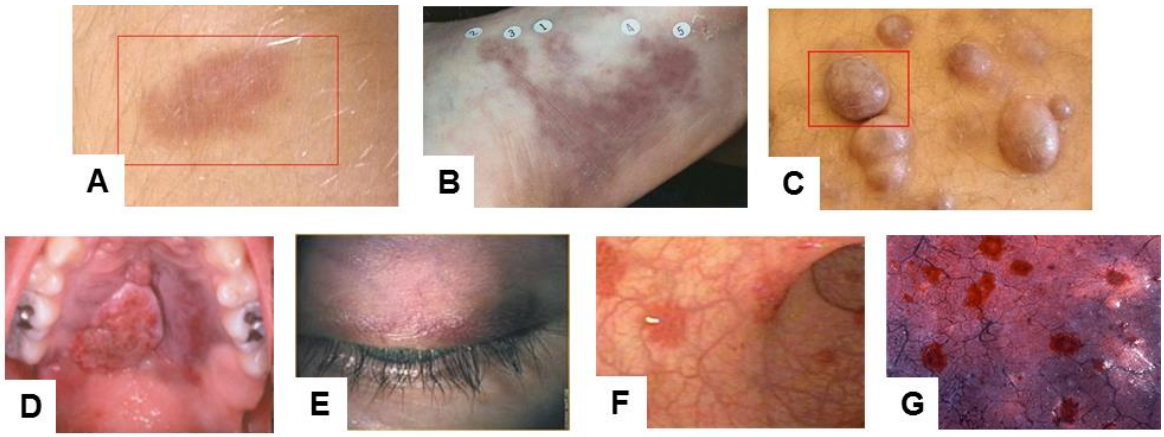


Figure 4 : Manifestations cutanées, muqueuses et viscérales de la MK
(Source personnelle ou d'après Hengge et coll., Lancet Infect Dis, 2002 et Di Lorenzo et coll., Lancet Oncol, 2007). A-B-C : lésions cutanées. A : maculeuse, B : papuleuse, C : nodulaires. D-E : lésions muqueuses. D : palatine, E : oculaire. F-G : lésions viscérales. F : digestives, G : pulmonaires.

L'étude histologique des tissus, plus ou moins complétée par une analyse immunohistochimique, permet de caractériser les trois stades de lésions (72-75) (Figure 5). Habituellement l'épiderme est sain et l'atteinte touche principalement le derme superficiel et profond :

- Macules : ces lésions débutantes présentent des ectasies (vaisseaux dilatés) et/ou une prolifération de petits vaisseaux dermiques semblables à des fentes vasculaires, accompagnées de globules rouges extravasés et d'un faible infiltrat lympho-plasmocytaire s'étendant autour de vaisseaux dermiques normaux.
- Papules : ces lésions plus avancées comportent par ailleurs une prolifération modérée de cellules fusiformes d'origine endothéliale, dites « *spindle cells* » (SC), souvent associées à des dépôts d'hémosidérine et à un infiltrat inflammatoire périvasculaire composés de cellules dendritiques dermiques et de lymphocytes B et T.
- Nodules : sont composés d'un vaste réseau de fentes bordées par une très grande quantité de SC envahissant une large partie du derme.

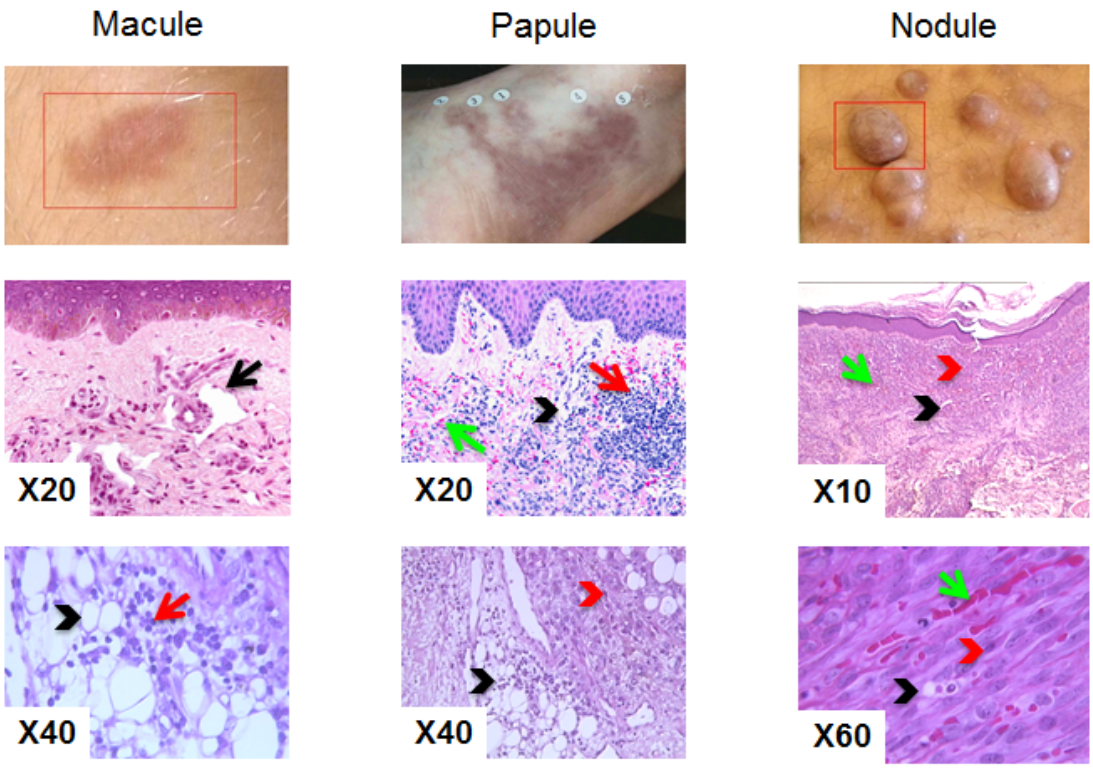


Figure 5 : Présentation histologique des lésions de MK
Macule : présence d'ectasies (flèche noire), de fentes vasculaires (chevron noir) et d'un infiltrat lymphoplasmocytaire (flèche rouge). Papule : présence de fentes vasculaires (chevrons noirs), d'un important infiltrat inflammatoire (flèche rouge), de quelques cellules fusiformes (chevron rouge) et de nombreux vaisseaux extravasés (flèche verte). Nodule : présence de fentes vasculaires (chevrons noirs), de globules rouges extravasés (flèches vertes), bordés par une intense prolifération de cellules fusiformes (chevrons rouges).

2) La maladie de Kaposi : Physiopathologie

A. Rôle de l'Herpès Virus Humain de type 8

1) Généralités

Le virus HHV-8 a été découvert en 1994 par Chang et Moore et est considéré comme l'agent étiologique principal de la MK (10). Il fait partie de la famille des herpès virus humains et de la sous-famille des gamma-herpès virus, comme le virus Epstein-Barr (EBV). Comme ce dernier, HHV-8 est un virus oncogène. Il est responsable des 4 formes épidémiologiques de MK, ainsi que de la maladie de Castleman et du lymphome des séreuses. Il est constamment retrouvé dans la MK et l'infection par le virus précède systématiquement le développement de la maladie (10, 76, 77).

Son ADN linéaire double brin code pour l'expression d'une centaine de gènes, dont le gène LANA (Latency-Associated Nuclear Antigen), indispensable à la latence et présentant des propriétés oncogéniques et pour des gènes mimant certains gènes humains, tels que l'interleukine (IL-) 6 virale (vIL-6), partageant 25% d'homologie avec l'IL-6 humaine ou le récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé aux protéines G viral (vRCPG), présentant de fortes homologies avec le récepteur à l'IL-8 humain (78, 79). Il code également pour des microARN (micro Acide Ribonucléique), qui participent à la régulation de l'expression des gènes de latence, à l'angiogenèse et inhibent l'apoptose en ciblant notamment les voies IκB et NF-κB (80-83) (Figure 6).

HHV-8 présente un tropisme pour les lymphocytes B, les cellules endothéliales et les progéniteurs endothéliaux et se trouve également dans les CMSP et les prélèvements cutanés de patients atteints de MK-VIH (cellules endothéliales et SC) (11). Le caractère multicentrique des lésions est donc probablement lié à la circulation de lymphocytes et monocytes porteurs du virus. Par ailleurs, la détection d'HHV-8 dans les CMSP est un facteur prédictif du développement d'une MK chez les sujets VIH.

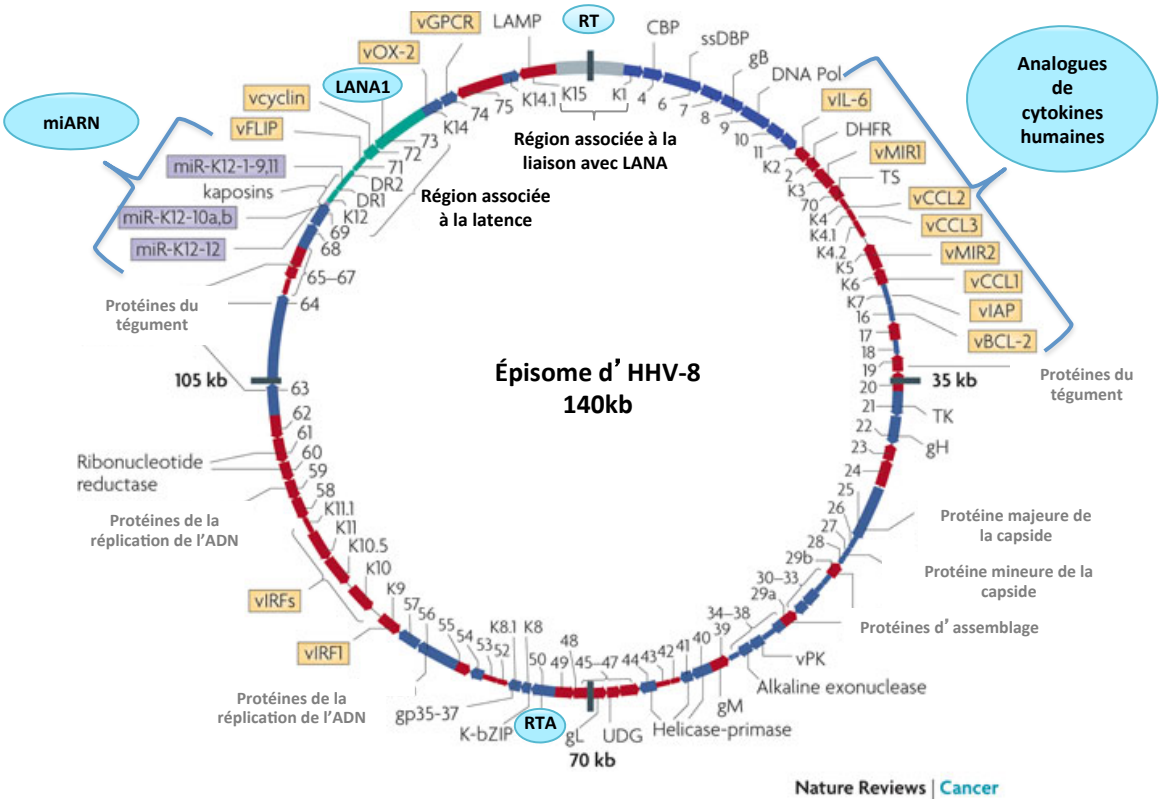


Figure 6 : Génome du virus HHV-8 sous forme épisomale

(Modifiée d'après Mesri et coll., Nature Review, 2010). HHV8 code notamment pour des microARN (miARN en violet), des gènes homologues de gènes humains (en jaune), des gènes de latence (en vert) et des gènes de la phase lytique (ex : RTA), Certains gènes jouent un rôle prépondérant dans la physiopathologie de la MK et dans l'oncogénèse, c'est notamment le cas des gènes LANA, vRCPG, vIL-6 et de certaines cytokines. LANA : *latency-associated nuclear antigen*, RTA : *reactivation transcriptional activator*, RT : régions terminales répétées, vRCPG : récepteur couplé aux protéines G viral, vIL-6 : Interleukine virale mimant l'interleukine 6 humaine.

2) Cycle viral d'HHV-8

Comme pour les virus du groupe Herpès, le cycle viral d'HHV-8 comporte deux phases : une phase de latence persistante et une phase lytique transitoire. Au cours de la première phase, il n'exprime qu'un nombre restreint de gènes, lui permettant de persister au sein des noyaux des cellules infectées, sous forme épisomale. Il limite ainsi la réponse immunitaire de l'hôte tout en favorisant la survie de la cellule infectée et sa propre persistance intranucléaire (84). Au cours de cette étape, HHV-8 est également capable de répliquer son ADN en détournant la machinerie cellulaire au moment de la phase S du cycle. Ce processus est fondamental pour le maintien d'un nombre constant de virus sous forme latente au cours des divisions cellulaires (85). Au contraire, pendant la phase lytique, un grand nombre de gènes viraux sont exprimés selon une cascade régulée dans le temps : expression des gènes alpha (*immediate early genes*) codant pour des protéines impliquées dans la transcription virale, puis bêta et gamma 1 (*early genes)* codant pour des protéines de régulation et quelques protéines structurales et enfin gamma 2 (*late genes*) codant pour des protéines majeures de

structure. Cette étape assure la formation de nouveaux virions infectieux, mais aboutit également à l'apoptose de la cellule hôte. Dans la MK, HHV-8 est principalement retrouvé sous forme latente (85).

Cependant, contrairement aux autres virus du groupe Herpès, il semble qu'HHV-8 puisse exprimer certains gènes de la phase lytique pendant la phase de latence (86). Il a notamment été mis en évidence que le recepteur Notch humain pouvait induire l'expression de gènes lytiques viraux tels que les gènes codant pour vIL-6 ou MIR2 (*Modulator of Immune Recognition-2* ou protéine K5), impliqués dans la croissance et l'immunomodulation ou encore que les *Human Lymphatic Endothelial Cells* infectées par HHV-8 sous forme latente exprimaient le gène lytique ORF45, impliqué dans l'activation de mTOR (87, 88).

3) Stratégies d'échappement d'HHV-8 au système immunitaire

Le virus HHV-8 dispose de 2 stratégies différentes d'échappement au système immunitaire : la mise en place de la latence et l'induction de l'expression de gènes aux propriétés immunomodulatrices (Tableau 2).

Au cours de la phase de latence, le faible nombre de gènes exprimés limite le nombre d'épitopes pouvant être détectés par le système immunitaire. Par ailleurs, HHV-8 est en mesure de moduler le système immunitaire inné et adaptatif. Il est par exemple capable de cibler le complément, la voie de signalisation de l'IFN de type 1 ou encore les Toll-Like récepteurs (TLR). Il a notamment été observé que la protéine KCP (*KSHV Complement Control Protein),* participait à la dégradation de la C3 convertase et inhibait ainsi la lyse par le complément des cellules infectées par HHV-8 (89). Le virus code également pour 4 facteurs de régulation de l'IFN (vIRF1-4), analogues des facteurs cellulaires humains IRF. Ces protéines virales participent à l'inhibition de la voie de signalisation de l'IFN de type 1 et à l'activité antivirale primitive induite par cette dernière (90). Il a également été rapporté qu'HHV-8 pouvait moduler certains signaux induits par les TLR, impliqués dans la reconnaissance de motifs viraux. Par exemple, le TLR-4 est impliqué dans la réponse immunitaire innée contre HHV-8, or, son expression est diminuée en cas d'infection des cellules endothéliales par HHV-8 (91). Il semble que cette régulation soit notamment médiée par le vRCPG et vIRF1-2.

Tableau 2 : Protéines codées et induites par le virus HHV-8, impliquées dans la physiopathologie de la MK

Protéines, miARN codés par HHV-8	Expression au cours du cycle cellulaire	Propriétés				
		Oncogènique	Anti-apoptotique	Immunomodulatrice	Pro-inflammatoire	Angiogénique
ORF73 (LANA-1)	Latence	X	X			X
ORF72 (vCyc)	Latence	X	X		X	
ORF71 (vFlip)	Latence	X	X			
K12 (Kaposin A)	Latence	X				
ORF74 (vRCPG)	Lytique (Early)	X			X	X
K1	Latence et lytique (Early)	X	X	X	X	X
K9 (vIRF1)	Lytique (Early)	X	X	X		
K11/11.1 (vIRF2)	Lytique			X		
K10.5/10.6 (vIRF3 ou LANA-2)	Latence		X	X		
ORF45 (Tégument)	Immediate Early			X		
ORF50 (RTA)	Immediate Early			X		
K2 (vIL-6)	Latence et Lytique (Early)			X	X	X
ORF4 (KCP)	Lytique (Late)			X		
K3 (MIR1)	Immediate Early			X		
K5 (MIR2)	Immediate Early			X		
K8 (KbZIP)	Immediate Early		X			
K7 (vIAP)	Litique (Late)		X			
ORF16 (vBCL-2)	Lytique (Early)		X			
K6, K4, K4.1 (vCCL-1, -2, -3)	Immediate Early				X	X
Kaposin B	Latence				?	
miRK1-12	Latence	X	X	X	X	X
Protéines induites par HHV-8	**Expression au cours du cycle cellulaire**	Oncogènique	Anti-apoptotique	Immunomodulatrice	Pro-inflammatoire	Angiogénique
c-Kit	-	X				
PDGF-R	-	X				X
CXCR7	-	X			X	X
IL-6	-	X			X	X
MMPs	-				X	X
Ang-2	-					X
HIF1α, HIF1β	-					X
Cox-2	-		X		X	X

(Modifié D'après Douglas *et al*, 2012 Transl Biomed). - : non adapté

Le virus est également capable de moduler le système immunitaire adaptatif. Les protéines MIR1 (K3) et MIR2 (K5) sont notamment capables d'induire l'endocytose des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I), induisant leur dégradation au sein des lysosomes et inhibant ainsi la présentation des peptides viraux aux lymphocytes T cytotoxiques (92, 93). D'autre part, la protéine MIR2 est capable d'inhiber l'expression de ICAM-1 et B7.2 à la surface de cellules BJAB (lignée cellulaire B de lymphome de Burkitt) transfectées par K5. La diminution d'expression de ces molécules de co-stimulation à la surface des lymphocytes B, suite à leur endocytose, induit une diminution de leur capacité à activer la réponse T cytotoxique (94). HHV-8 code également pour trois chimiokines : vCCL-1, vCCL-2, et vCCL-3 (95). Ces protéines sécrétées, au pouvoir chimiotactique, peuvent favoriser une réponse immunitaire de type T helper (Th) de type 2 en se liant à leurs récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G (RCPG) : CCR3, CCR4 et CCR8. Ces derniers sont présents à la surface des lymphocytes Th2. Ces chimiokines attirent donc ces cellules au niveau des lésions de MK. Au contraire, HHV-8 inhibe la réponse Th1, via le blocage par vCCL2 de CCR1 et CCR5 présents à la surface des lymphocytes Th1 (96-98). Ce microenvironnement inflammatoire créé par HHV-8 permet ainsi au virus d'échapper à la réponse immunitaire antivirale.

La Figure 7 récapitule les mécanismes mis en place par HHV-8 pour échapper au système immunitaire, connus à ce jour.

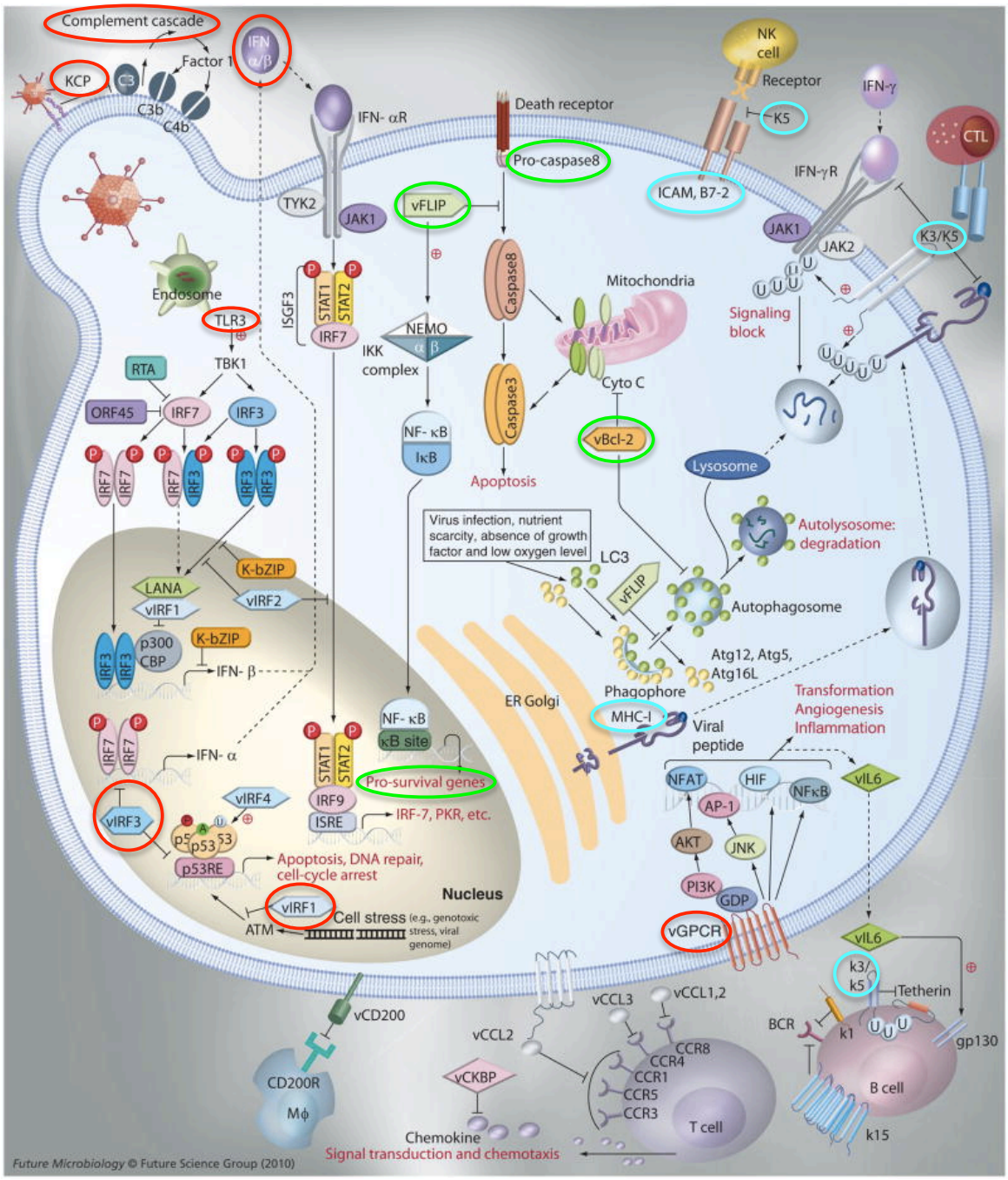


Figure 7 : Mécanismes d'échappement au système immunitaire mis en place par HHV-8

(Modifiée d'après Lee et coll., Future Microbiol, 2011). HHV-8 est capable de moduler l'immunité innée (cercle rouge), en ciblant notamment le complément, la voie de signalisation de l'IFN de type 1 ou encore les Toll-Like récepteurs. Il met également en place des moyens d'échappement au système immunitaire adaptatif (cercle turquoise), en inhibant l'expression des molécules du CMH I ou encore les molécules de co-stimulation ICAM1 et B7.2. Il est également capable d'inhiber l'apoptose (cercle vert) assurant la survie des cellules infectées. CCR: CC-chimiokine recepteur; GPCR: récepteur aux chimiokines couplé aux protéines G; LANA: Latency-associated nuclear antigen; MHC-1 : Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I) ; NK: cellules Natural killer; RTA: *reactivation transcriptional activator* ; TLR: Toll-like recepteur.

4) Processus physiopathologiques induits par HHV-8

L'infection des cellules cibles par HHV-8 induit des changements morphologiques, métaboliques, d'expression génique, de prolifération et de survie cellulaire (11). Après infection des cellules endothéliales par le virus, ces dernières perdent leur morphologie classique, acquièrent un phénotype fusiforme et expriment des marqueurs endothéliaux à la fois vasculaires et lymphatiques (99, 100). Ces modifications s'expliquent par l'effet de certaines protéines virales telles que vFLIP, qui participe à l'acquisition de la morphologie fusiforme, mais aussi par l'effet d'HHV-8 sur l'expression de certains gènes cellulaires (101, 102). Il est notamment capable d'induire l'expression de c-Kit, un récepteur de tyrosine kinase et de CXCR7, un récepteur à sept domaines transmembranaires, ayant montré *in vitro* leur pouvoir de modification morphologique sur les cellules endothéliales (103, 104). Il active également l'expression de l'oncogène Pax, impliqué dans la transformation des cellules endothéliales vasculaires humaines (105). Enfin, HHV-8 est capable d'induire l'expression de Prox-1, un régulateur de la différenciation lymphatique (106).

Parmi les protéines codées ou induites par HHV-8, un grand nombre présente des propriétés oncogéniques, anti-apoptotiques, immunomodulatrices, pro-inflammatoires ou angiogéniques (Tableau 2). Certaines d'entre elles, telles que vFLIP ou vBCL2, sont notamment capables d'inhiber l'apoptose. La première, par exemple, bloque l'activation de la caspase 8 et active l'expression de protéines anti-apoptotiques (107), tandis que la seconde bloque l'activité pro-apoptotique de la protéine Bax (108) (Figure 7). D'autres protéines ont également un pouvoir oncogénique, soit *in vitro* via la transformation de lignées cellulaires, soit *in vivo* via l'induction de tumeurs chez des souris. C'est notamment le cas de la protéine vIL-6. Après transfection de la protéine dans des lignées cellulaires NIH 3T3, dérivées de fibroblastes embryonnaires de souris et injection dans des souris *nude*, Aoki et coll. ont observé le développement rapide de larges tumeurs, richement vascularisées, au site d'injection, contrairement aux souris recevant des cellules NIH 3T3 transfectées par un vecteur contrôle (109). La protéine vRCPG, elle aussi présente des propriétés oncogéniques. Dans 3 modèles murins différents, elle induit le développement de maladies angioprolifératives, de nodules vasculaires multicentriques ou encore de tumeurs vasculaires multiples, cutanées et viscérales, d'évolution fatale, proches de la MK (110-112). Globalement, les mécanismes physiopathologiques induits par HHV-8 sont complexes, multiples et certains restent à explorer. Une large proportion des protéines exprimées par ce dernier sont pléïotropes, les propriétés spécifiques de LANA sont abordées en détails ci-après.

5) Propriétés de la protéine LANA

LANA est la protéine la plus fortement exprimée au cours de la phase de latence (85). Cette protéine intranucléaire, multifonctionnelle est capable d'interagir avec différentes protéines et facteurs de transcription cellulaires et viraux (Figure 8).

Elle joue un rôle critique dans la maintenance, la réplication et la répartition correcte du génome viral au sein des cellules en division. Elle est notamment capable de maintenir la latence et de réprimer l'expression des gènes viraux lytiques, via la répression de l'expression du RTA (*Reactivation Transcriptional Activator*), une protéine majeure impliquée dans le passage de la phase de latence à la phase lytique (85, 113). Elle permet également à HHV-8 de persister sous forme épisomale dans le noyau des cellules infectées. Pour ce faire, elle crée une liaison directe entre sa région C-terminale et les régions terminales répétées (RT) de l'ADN proviral d'une part et sa région N-terminale et les protéines des histones d'autre part, assurant ainsi un attachement à la chromatine cellulaire, y compris en cas de mitose cellulaire (85, 113). Les RT d'HHV-8 contiennent une origine de réplication. Sa liaison avec LANA assure la réplication de l'ADN viral pendant la phase de latence. En effet, LANA constitue un promoteur de réplication en recrutant des composants cellulaires impliqués dans le complexe pré-réplicatif (114). De plus, le complexe LANA-RT semble capable de recruter les protéines cellulaires impliquées dans la réplication de l'ADN (85). Enfin, LANA participe à la bonne répartition des épisomes d'HHV-8 au cours de la division cellulaire (115). Elle assure une liaison entre le génome viral et le centromère des chromosomes mitotiques, notamment via la formation d'un complexe avec des protéines du kinétochore (complexe protéique permettant la liaison des microtubules aux chromosomes en mitose).

LANA joue également un rôle oncogénique. Elle est notamment capable d'inhiber l'apoptose, d'induire la prolifération et la transformation cellulaire. Il a par exemple été montré sur des lignées cellulaires stables que l'expression de LANA induisait une augmentation spectaculaire de l'instabilité chromosomique, avec un accroissement des multi-nucléations, des micronoyaux et des centrosomes aberrants, mais aussi une prolifération plus rapide et une durée de vie cellulaire prolongée (116, 117). Elle interagit avec de nombreux facteurs de transcription intracellulaires tels p53, pRB, ou GSK3β (Figure 8). Le premier est un gène suppresseur de tumeur, impliqué dans le contrôle de l'apoptose des cellules en cas de dommage de leur ADN. LANA est capable de se lier directement à p53 et de le bloquer, inhibant ainsi son activité transcriptionnelle. Elle est aussi capable d'induire sa dégradation, aboutissant à l'inhibition de la mort cellulaire induite par ce facteur (116, 118, 119). Enfin, en

ciblant pRB et GSK3β, LANA peut moduler le passage de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire (120).

Il a également été suggéré que LANA puisse induire une augmentation de l'expression du récepteur 1 et 2 du Vascular Endothelial Growth Factor (VEGFR-1 et -2) par interaction avec les protéines Daxx et ETs-1, elles-mêmes capables d'inhiber l'expression du gène VEGFR-1. Ceci pourrait contribuer à la forte expression de VEGFR dans les tissus de MK et à l'angiogenèse induite par ce dernier en présence de son ligand (121). Par ailleurs, l'induction par LANA de l'expression de l'emmprin, connue pour être impliquée dans l'angiogenèse et la formation de métastases dans différents cancers, conforte le rôle de LANA dans l'angiogenèse (4).

HHV-8 a donc mis en place de nombreux procédés d'échappement au système immunitaire et mécanismes d'oncogénèse, lui permettant de persister au sein des cellules infectées et de contribuer au développement de la MK. Cependant, comme nous l'avons vu précédemment, la séroprévalence d'HHV-8 dépasse largement l'incidence de la MK, soulignant l'existence de cofacteurs nécessaires au développement de la pathologie (122). Parmi ces cofacteurs, figurent l'immunosuppression, les facteurs environnementaux et génétiques et l'existence d'un microenvironnement riche en cytokines et facteurs de croissance.

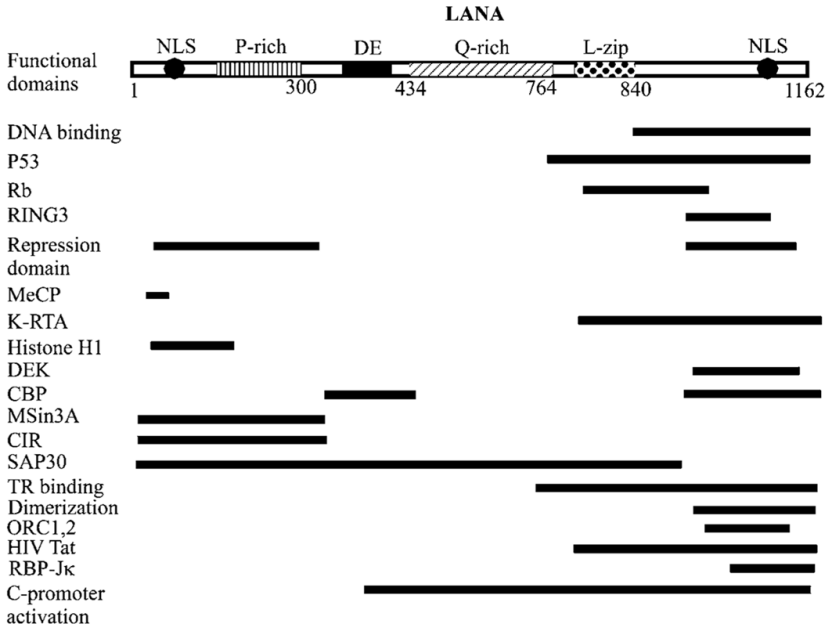


Figure 8 : Structure et domaines fonctionnels de la protéine LANA

(D'après Verma et coll., Curr Top Microbiol Immunol 2013). LANA est une protéine nucléaire de 1162 acides aminés (indiqué en chiffre). Elle présente un domaine N-terminal riche en proline (*P-rich*), une région centrale riche en acide glutamique et aspartique (*DE*), en glutamine (*Q-rich*) et présentant un domaine leucine-zipper (*LZ*). LANA possède également 2 séquences d'adressage au noyau (*NLS*) au niveau N- et C-terminal. La position des domaines fonctionnels de LANA est représentée par des *barres noires.* LANA peut interagir avec de nombreuses protéines cellulaires (p53, Rb, RING3, RBP-Jκ) et virale (*HIV Tat*). Elle peut également se lier à l'ADN du virus HHV-8 (*TR binding,* K-RTA) et à celui de la cellule hôte (via la liaison aux histones H1, à MeCP, DEK, CBP, MSin3A, ORC). Ceci permet de maintenir le virus sous forme épisomale lié à la chromatine et assure sa réplication latente.

B. Rôle des cofacteurs

1) Immunosuppression et activation immunitaire

Avant l'arrivée des ARV, la probabilité de développer une MK pour les patients co-infectés par le VIH de type 1 (VIH-1) et HHV-8 été estimé entre 20 et 50 000 fois supérieure à celle de la population générale (123). Depuis, le risque relatif de développer une MK-VIH a diminué de plus de 80%, notamment chez les patients présentant un taux de lymphocytes T CD4 élevé, atteignant un risque relatif environ 3 600 fois supérieur à celui de la population générale (124-126). De même, les patients bénéficiant d'une greffe d'organe, présentent un risque de développer une MK au moins 500 fois supérieur à celui de la population générale (127). La régression de la MK, fréquemment observée en cas d'allègement ou de changement de stratégie immunosuppressive chez les patients atteints de MK-iatrogène, tout comme le risque diminué de MK-VIH en cas d'amélioration du taux de CD4 mettent en avant le rôle majeur de l'immunosuppression comme cofacteur du développement de la pathologie (128).

Cependant, la probabilité de développer une MK chez les patients VIH reste 300 fois supérieure à celle des patients greffés (123). Il a été démontré sur un sous-groupe de patients issus de la base de données hospitalière française sur l'infection par le VIH de l'ANRS (FHDH ANRS CO4), présentant une immunité restaurée depuis au moins 2 ans (lymphocytes T CD4 $\geq 500/mm^3$) et CV VIH $\leq$ 500 copies/ml que le risque relatif de développer une MK restait 35 fois supérieur à celui de la population générale (125), soulignant l'existence de facteurs de risque directs liés à l'infection par le VIH elle-même et non seulement à l'immunosuppression.

La MK-classique, quant à elle, survient préférentiellement chez des hommes âgés. Chez ces derniers, il semble que la diminution de l'immunité cellulaire, la modification du ratio lymphocytes Th1/Th2 ou encore une activation immune inadaptée, participent au développement de la maladie (129, 130). Globalement, il a été observé chez les patients atteints de MK une activation immunitaire chronique, notamment de type Th1 et CD8. En effet on retrouve chez ces patients des taux de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1, l'IL-6, le TNF-α et l'IFN-γ, mais aussi de neopterine et β2-microglobuline ou de CD8 solubles augmentés, témoins de cette activation chronique (131, 132). Cette dernière associée à une immunosuppression, pourrait favoriser la dissémination du virus HHV-8 dans les cellules circulantes et les tissus des patients, jouant ainsi un rôle de cofacteur dans le développement de la MK (133). L'existence d'anomalies immunitaires locales notamment au niveau des vaisseaux lymphatiques des patients atteints de MK-classique, est également

rapportée (134, 135). Bien que les résultats des études soient parfois contradictoires et que l'exploration des mécanismes physiopathologiques de la MK-classique soient encore nécessaires, le rôle de l'immunosuppression et de l'immuno-activation semblent importants dans la survenue de cette forme de MK (130, 132).

Dans la MK-endémique, là encore une diminution de l'immunité locale, notamment au niveau de la circulation lymphatique, semble favoriser l'apparition de la maladie. Celle-ci pourrait-être liée à la présence de sols volcaniques argileux dans certaines zones à forte prévalence. L'aluminosilicate et l'oxyde de fer contenus dans ces terrains, peuvent traverser les pores de la peau et induire des dommages au niveau des vaisseaux lymphatiques, provoquant une diminution de l'immunité locale (136). Ceci suggère l'existence de cofacteurs environnementaux dans le développement de la MK, qui seront développés ci-après.

2) Facteurs environnementaux

Parmi les différents facteurs environnementaux proposés, concourant au développement de la MK figurent les insectes hématophages. Leur rôle a été suggéré dans la transmission du virus HHV-8, sans que cette hypothèse n'ait pu être formellement confirmée. En effet, l'incidence de MK semblait élevée dans certaines zones italiennes où sévissaient les anophèles, avec dans les années 50 une diminution de cette dernière parallèlement aux campagnes anti-malariques menées (137). De plus, dans ce pays, l'incidence de la MK était d'autant plus élevée que la densité d'espèces de moustiques potentiellement vectrices d'HHV-8 était importante (138). De même, dans une étude cas-contrôles menée en Ouganda, la MK semblait se manifester préférentiellement chez les patients piqués par des insectes hématophages semblables à des *Haematopa* (139). Cependant, la MK-endémique apparaît également en altitude, dans des zones d'Afrique où les anophèles sévissent peu (136, 140). HHV-8 n'a jamais été retrouvé dans le sang de ces insectes. Des hypothèses suggèrent donc que les insectes hématophages puissent constituer un facteur de risque via l'immunomodulation induite par les crises de paludismes répétées ou les autres agents infectieux transmis par ces derniers (122).

Naître ou vivre dans une zone présentant des sols volcaniques argileux constitue également une menace. En Italie, un risque presque doublé de développer une MK a été rapporté dans ces populations (141). De même, en Afrique l'exposition chronique aux argiles volcaniques et la marche pieds nus en contact avec des sols humides, apparaissent comme des facteurs prédisposant au développement d'une MK (136, 142). Comme nous l'avons vu, cela pourrait s'expliquer par la présence de particules très fines d'aluminosilicate ou encore

kaolinites dans le sol, pouvant induire des dommages lymphatiques et une diminution de l'immunité locale (122). Les zones volcaniques sont également riches en oxyde de fer, augmentant l'exposition des populations à ce métal, notamment via l'eau et les végétaux. Or le fer pourrait participer à l'apparition de la maladie. En effet, il a été observé *in vitro* que le traitement de cellules issues de lésions de MK par des sels de fer entrainait une augmentation de la croissance cellulaire, tandis que l'ajout de chélateur du fer inhibait cette croissance et induisait l'apoptose des cellules (143, 144). De plus, le traitement de *Human Dermal Microvascular Endothelial Cells* (HDMEC) par des sels de fer, induisait l'expression de signaux anti-apoptotiques tels que Bcl-2, aboutissant à une survie cellulaire prolongée (145). Le fer est également capable d'induire l'expression de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-6, connue pour être impliquée dans la physiopathologie de la MK (146). Enfin, la présence de globules rouges extravasés et d'hémosidérine dans les lésions de MK pourrait être une source de fer utile à la croissance des cellules endothéliales et des SC (147) (Figure 5).

L'exposition à certains vasodilatateurs, tels que les nitrites par voie inhalés, notamment utilisés sous la forme de drogues récréatives (poppers) par les HSH, a également été proposée comme facteur de risque de développer une MK dans la population VIH (148-150). Ceci pourrait s'expliquer par la présence de métabolites mutagènes ou encore par l'effet négatif des nitrites sur l'immunité anti-infectieuse et sur les cellules endothéliales (151). D'autres molécules présentant des propriétés vasodilatatrices, tels que les inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC) sont soupçonnées de pouvoir induire l'apparition d'une MK, avec une régression ou une amélioration spontanée de la maladie possible à l'arrêt du traitement incriminé (152-156). Cependant, ces résultats restent controversés, puisque les IEC ont également été décrits comme protecteurs dans un autre cas rapporté (157). Dans une étude cas-contrôle récente, il a été montré que les patients développant une MK-classique recevaient plus fréquemment des IEC ou des sartans que les patients contrôles (158). Globalement chez un patient recevant un traitement par un inhibiteur du système rénine-angiotensine et développant une MK-classique, l'arrêt de ce traitement pourrait donc être une première étape dans la prise en charge de la maladie.

3) Facteurs génétiques

Le ratio homme/femme de la MK est en défaveur des hommes dans au moins 3 de ses 4 formes cliniques (entre 10 et 15 hommes pour 1 femme dans la MK-classique, 3 pour 1 dans la MK-endémique, et jusqu'à 50 hommes pour 1 femme dans la MK-VIH). La régression de lésions de MK observée chez certaines femmes enceintes suggère un effet protecteur de

l'hormone chorionique gonadotrope dans la MK, mais les essais cliniques utilisant cette hormone comme traitement de la maladie, n'ont pas démontré d'effet (159).

L'incidence particulière de la MK-classique au niveau du pourtour méditerranéen et chez les juifs ashkénazes suggère l'existence de facteurs génétiques. Cependant, dans cette population l'influence génétique ou géographique est difficile à distinguer. Une étude menée aux Etats-Unis auprès de patients juifs nés en Europe de l'Est et du Sud, montrait une incidence augmentée de MK-classique chez ces derniers, tandis que leurs enfants nés aux Etats-Unis semblaient avoir un risque moindre, suggérant l'impact majeur de l'environnement dans le développement de la MK (160). D'autres travaux, ont rapporté l'existence d'une association entre le génotype HLA-DR5 et la MK, notamment en Grèce et aux Etats-Unis, au début de l'épidémie de VIH (161-163). Mais ces résultats n'ont pu être confirmés dans d'autres études, notamment chez des patients atteints de MK-endémique ou de MK-VIH (164, 165). La protéine MDM2, connue pour ses propriétés pro-oncogénique, notamment via le contrôle de la protéine p53, a été étudiée dans la MK-classique et endémique. Un polymorphisme naturel existe sur le promoteur du gène *MDM2,* consistant en la substitution d'une guanine par une thymine, à l'origine d'une augmentation de la production de MDM2. Le génotype hétérozygote (T/G) sur le promoteur de ce gène a été plus fréquemment retrouvé parmi les cas de MK-classiques, tandis que le génotype homozygote G/G était moins souvent présent chez ces patients (166).

Dans la MK-classique, sur une cohorte italienne infectée par HHV-8, il a été rapporté que certains diplotypes du gène du *récepteur β à l'IL-8* diminuaient le risque de développer cette pathologie, tandis que d'autres sur le promoteur du gène de l'*IL-13* augmentaient ce risque (167). Enfin, dans la MK-iatrogène, un polymorphisme du promoteur du gène de l'*IL-6* à l'origine d'une production accrue d'IL-6 a été associé au risque majoré de développer une MK chez les patients transplantés rénaux (168).

Globalement, malgré une très probable implication des facteurs génétiques dans la MK, peu de données validées sont disponibles à l'heure actuelle.

C. Rôle des cytokines, chimiokines et facteurs de croissance

Comme décrit précédemment, la MK est une pathologie multifactorielle reposant sur la présence du virus HHV-8, dans un contexte d'immunosuppression et d'inflammation chronique, dans lequel les cytokines jouent un rôle clé (169).

1) Cytokines et facteurs de croissance du microenvironnement

Le rôle des cytokines, chimiokines et facteur de croissance semble primordial dans la physiopathologie de la MK (2, 12, 169). En effet, le microenvironnement des lésions de Kaposi est constitué de nombreux facteurs de croissance, cytokines et chimiokines pro-inflammatoires, ainsi que de marqueurs de l'activation des lymphocytes T CD8, tels que le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), le basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), le Tumor Growth Factor-β (TGF-β) ou encore l'IL-1ß, le Tumor Necrosis Factor α (TNF-α) et l'IFN-γ, participant à la croissance, la progression et la dissémination des lésions (Figure 9) (2, 133, 170, 171).

Il a été montré *in vitro* que l'exposition pendant 48h de lymphocytes B à HHV-8, induisait une augmentation de la production d'IL-6, d'IL-8 et de TNF-α (172). Par ailleurs, le surnageant de culture de CMSP ou de lésions cutanées issues de patients atteints d'une MK produisent de l'IFN-γ, du TNF-α, de l'IL-1β, de l'IL-2 et de l'IL-6 (133, 170). Certains de ces facteurs sont également retrouvés dans le sérum de patients développant une MK ou à risque de la développer. Il contient par exemple des taux élevés de bFGF (173). Knowlton et coll. ont également démontré que les patients co-infectés par HHV-8 et le VIH, présentaient dans l'année précédant le diagnostic de MK-VIH des taux de TNF-α supérieurs à ceux retrouvés chez les patients ne développant pas cette pathologie (172).

Les lymphocytes B et les monocytes de patients atteints de MK mis en culture avec un environnement riche en cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF-α, l'IL-6 et surtout l'IFN-γ présentent une CV HHV-8 augmentée, suggérant leur implication dans la physiopathologie de la MK (170). Chez des Ougandais, il a été rapporté un état d'activation immune, non retrouvé chez des donneurs de sang sains italiens, avec notamment des taux d'IL-2 et d'IL-10 élevés chez les patients non infectés par le VIH (174). Ceci suggère que l'activation immune est propice au développement de la MK-endémique.

L'effet spécifique de certaines cytokines, telles que le TNF-α, l'IFN-γ, L'IL-1α/β, l'IL-8 et le bFGF, a également été étudié *in vivo*. Elles peuvent présenter des propriétés angiogéniques, participer au recrutement des cellules circulantes, à la prolifération cellulaire, induire l'expression de gènes codés par HHV-8 ou la transformation des cellules endothéliales en SC. Le TNF recombinant et l'IFN-γ peuvent également conduire à la progression de la MK en cas d'administration systémique (170, 175-179). Les données relatives aux effets de ces cytokines sont résumées dans le Tableau 3.

L'ensemble de ces données témoigne de la nécessité d'un processus inflammatoire dans l'apparition de la MK. L'effet paracrine ou autocrine des cytokines produites par les SC

concourent à la physiopatholgie de la maladie, comme le suggère l'apparition de lésions hautement angiogéniques, mimant les lésions de MK, suite à l'inoculation de SC issues de lésions de Kaposi chez des souris nude (180, 181).

Tableau 3 : Expression et rôles *in vivo* des cytokines, chimiokines et facteurs de croissance impliqués dans la MK :

Cytokines chimiokines facteurs de croissance	Effets angio-géniques	Recrutement de cellules circulantes	Transformation des cellules endothéliales en SC	Induction de la prolifération cellulaire	Augmentation de l'expression de gènes codés par HHV-8	Progression de la MK en cas d'administration systémique
TNF-α		X	X	X		X
IFN-γ		X	X			X
IL-1-α et β		X	X		X	
IL-8	X	X				
bFGF	X			X		
IL-6	X	X	X			

(Modifié d'après Ensoli et al. Eur J of Cancer 2001). TNF-α : *Tumor Necrosis Factor* alpha, IFN-γ : Interféron gamma, IL : interleukine, bFGF : *basic Fibroblast Growth Factor*.

2) Cytokines et chimiokines produites par HHV-8

Comme décrit plus tôt, le virus HHV-8 exprime lui-même de nombreuses protéines, jouant un rôle fondamental dans la tumorigénèse, parmi lesquelles des cytokines, des chimiokines, ainsi que des récepteurs de chimiokines (182). La cytokine vIL-6 joue un rôle clef dans la MK, à la fois dans l'apparition de la maladie, comme montré précédemment chez les souris nude, mais aussi dans sa progression (109). Cette viriokine est capable de se lier directement à la gp130, la sous-unité béta du récepteur à l'IL-6 (IL-6-Rb), présente à la surface des cellules de MK et de les activer, sans avoir recours à la formation d'un complexe avec la sous-unité CD126 (IL6-Ra) du récepteur à l'IL-6. Les cellules stimulées pendant 24h par vIL-6 sur-expriment la protéine PTX3, à l'origine de dommages tissulaires locaux et du recrutement de cellules de l'immunité (183). Globalement, il a été montré que vIL-6 était une cytokine pléïotrope impliquée dans l'hématopoïèse, la plasmocytose et l'angiogénèse (109).

Les trois chimiokines vCCL-1, vCCL-2, et vCCL-3 codées par HHV-8, outre leurs fonctions immunomodulatrices décrites précédemment, sont également capables de promouvoir l'angiogénèse via l'induction de l'expression de VEGF (184).

HHV-8 exprime par ailleurs un vRCPG constitutivement actif (79). Cette protéine virale semble jouer un rôle majeur dans l'angiogénèse via l'activation des voies de signalisation impliquant NF-κB, AP1 et NFAT, aboutissant à la secrétion de nombreux facteurs angiogéniques (VEGF, bFGF, IL-2, -4, -6, -8) (185, 186). Elle dispose de nombreux ligands, certains agissant comme des agonistes et d'autres comme des agonistes inverses (187). La chimiokine CXCL12, constitue un agoniste inverse du récepteur, qui possède des

effets opposés aux agonistes et participe ainsi à la régulation de la néovascularisation induite par le vGPCR et à la migration de cellules endothéliales au niveau des lésions (187, 188).

Globalement, les cytokines, chimiokines et facteurs de croissance tiennent une place prépondérante dans la physiopathologie de la MK. Les rôles plus précis des protéines du trio CXCL12, CXCR4 et CXCR7 vont être détaillés ci-après.

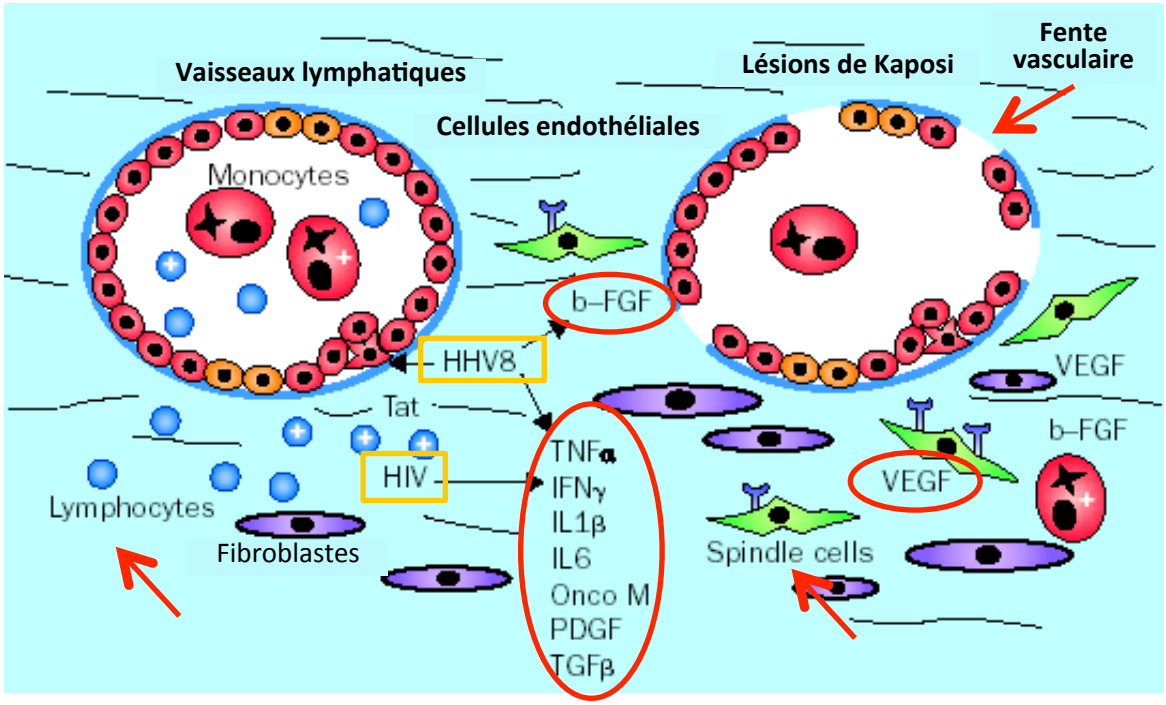


Figure 9 : Rôles des cytokines, chimiokines et facteurs de croissance dans la pathogénie de la MK-VIH
(Modifiée d'après Hengge et coll., Lancet Infect Dis, 2002) le microenvironnement des lésions de Kaposi est constitué de nombreuses cytokines et chimiokines pro-inflammatoires, participant à la croissance, la progression et la dissémination des lésions. Les virus HHV-8 et VIH induisent une augmentation de la production de certaines cytokines, récepteurs et facteurs de croissance. Ils sont notamment capables d'induire une surexpression de TNFα, IFN-γ, IL-1-ß, IL-6, etc, aboutissant à la transformation des cellules endothéliales en cellules fusiformes, dites spindle cells, à la prolifération de ces cellules, à la formation de néovaisseaux fenêtrés également appelés fentes et à l'attraction de cellules inflammatoires (lymphocytes, plasmocytes, *etc.*) au sein des lésions. HHV-8 : Virus de l'Herpès Humain-8, HIV : virus de l'immunodéficience humaine, TNFα : *Tumor necrosis factor* α, IFN-γ : Interféron γ, IL : Interleukine, PDGF : *platelet-derived growth factor*, TGF-ß : *Tumor growth factor* ß, bFGF *basic fibroblast growth factor*, VEGF : *vascular endothelial growth factor.*

D. Rôle du trio CXCL12/CXCR4-CXCR7

1) Activités physiologiques du trio

a. CXCL12

CXCL12, également connue sous le nom de Stromal cell-Derived Factor 1 (SDF-1), est une chimiokine au pouvoir chimio-attractant, Elle se lie spécifiquement à 2 RCPG : CXCR4 et CXCR7.

CXCL12 présente une structure très conservée entre les espèces, témoin de son rôle de chimiokine primitive, indispensable à la régulation de différentes fonctions physiologiques dites « homéostatiques » (189). Il existe six isoformes de CXCL12. Les 2 principales, α et β,

dérivent d'un même gène subissant un épissage alternatif pour donner respectivement des protéines de 68 et 72 acides aminés (AA), différant uniquement au niveau de leurs parties C-teminales (190). La forme α est la forme prédominante au niveau de la moelle osseuse et des cellules endothéliales. Sa sécrétion améliore la réparation tissulaire, mais elle subit une protéolyse sanguine rapide. L'isoforme β, elle, résiste mieux à l'hydrolyse et permet de stimuler l'angiogenèse. Elle est présente en grande quantité au niveau des tissus richement vascularisés (foie, rate, reins, etc.) (190). Quatre autres isoformes ont également été identifiées selon le nombre d'AA C-terminaux supplémentaires : CXCL12γ (+30 AA) principalement localisée au niveau du cerveau et du cœur, CXCL12δ (+31 AA), CXCL12ε (+1 AA) et CXCL12φ (+51 AA) (191).

CXCL12 est constitutivement exprimée par de nombreux tissus et types cellulaires, telles que les cellules stromales, épithéliales et endothéliales et est impliquée dans des activités homéostatiques tels que le développement hématopoïétique, nerveux, cardiaque ou encore vasculaire (192). Son expression peut également être induite en condition inflammatoire ou par différents facteurs de stress, tels que l'utilisation d'agents induisant des dommages à l'ADN (irradiation, chimiothérapies cytotoxiques à base de cyclophosphamide ou de 5-Fluoro-uracile) (193) ou encore par l'hypoxie. Cette dernière peut promouvoir l'expression de CXCL12 via l'induction du facteur HIF-1α (Hypoxia Inductible Factor-1α) qui possède 2 sites de liaisons au niveau du promoteur du gène *CXCL12* (194-197).

L'activité de la chimiokine est modulée par son interaction avec les glycosaminoglycanes présents à la membrane des cellules productrices et permettant de la concentrer au niveau de sites spécifiques (198, 199), mais aussi par différents clivages protéolytique au niveau N- et C-terminal, modulant sa capacité de liaison et/ou d'activation à CXCR4 (197, 200).

Au niveau hématopoïétique, CXCL12 participe notamment à la myélopoïèse, la lymphopoïèse B ou la domiciliation des polynucléaires neutrophiles sénescents au sein de la moelle osseuse (Tableau 4) (201). Elle participe également à la rétention et la migration des cellules souches hématopoïétiques dans les différentes niches de la moelle osseuse (202-205). La sécrétion de CXCL12 au niveau des vaisseaux et tissus lésés est également primordiale dans le recrutement de cellules souches endothéliales et dans la réparation tissulaire (206). Les effets de CXCL12 peuvent varier en fonction du type cellulaire et du récepteur considérés. Il a par exemple été montré *in vitro*, que la migration des mélanocytes matures se faisait sous le contrôle de l'axe CXCL12/CXCR7, tandis que la migration des mélanoblastes

était gouvernée par l'axe CXCL12/CXCR4 (207, 208). Enfin, *in vitro* CXCL12 est un puissant inhibiteur de l'entrée du VIH dans les lymphocytes T CD4 par liaison et internalisation de son récepteur CXCR4 (209, 210).

b. CXCR4

CXCR4 a d'abord été connu sous le nom de fusin et identifié comme co-récepteur de fusion et d'entrée du VIH dans les lymphocytes T CD4 (211, 212). Contrairement à la plupart des récepteurs de chimiokines, CXCR4 ne possède qu'un ligand chimiokinique : CXCL12. La région N-terminale et la dernière boucle extracellulaire du récepteur constituent des sites de fixation pour CXCL12, permettant l'activation de diverses voies de signalisation, en fonction du type cellulaire considéré (Figure 10) (213). On observe notamment le recrutement des protéines G, se fixant au motif DRY de la 2ème boucle intracellulaire de CXCR4, a l'origine de l'activation des voies PI3-Kinase /Akt, phospholipases C/IP3 et Ras-Raf/MAP-Kinase (Figure 11) (214, 215). L'axe CXCL12/CXCR4 signalise également *via* les β-arrestines : après phosphorylation par les GRK, ces protéines adaptatrices peuvent se lier au récepteur au niveau intracellulaire et induire sa désensibilisation et son internalisation, mais aussi leur propre cascade de signalisation (Figure 10, Figure 11) (216-220). Ces différentes voies régulent notamment la migration, la survie et la prolifération cellulaire (Figure 11).

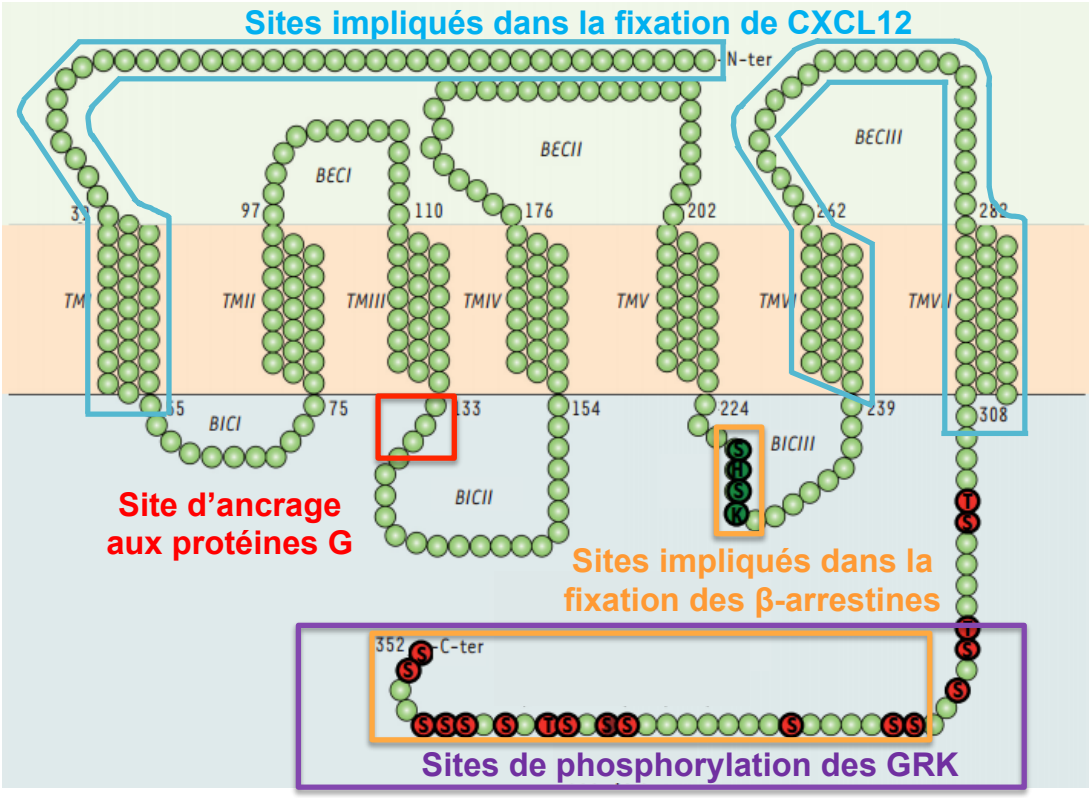


Figure 10 : Structure du récepteur CXCR4
(Modifiée d'après Bignon et coll., médecine/sciences 2011). BEC : Boucle extracellulaire ; BIC : Boucle intracellulaire ; GRK : G-protein coupled receptor kinases ; S : Ser ; SHSK : Ser/His/Ser/Lys ; T : Thr ; TM : domaine transmembranaire

Tout comme CXCL12, CXCR4 présente une expression ubiquitaire, à la fois au niveau des tissus hématopoïétiques (cellules stromales médullaires ou thymiques) et des tissus non hématopoïétiques tels que le cœur, les intestins, le cerveau, le rein ou les cellules endothéliales (201, 221). Le rôle primordial de l'axe CXCL12/CXCR4 dans le développement embryonnaire, l'organogénèse et l'hématopoïèse a été mis en évidence chez des souris invalidées pour *Cxcr4* ou *Cxcl12*. Ces dernières présentaient un défaut de développement cardiaque, vasculaire, digestif et hématopoïétique conduisant à leur décès précoce *in utero* (222, 223). L'axe de signalisation CXCL12/CXCR4 joue donc un rôle majeur dans les processus d'organogénèse, d'angiogenèse, de neurogénèse, d'hématopoïèse et de trafic leucocytaire (Tableau 4).

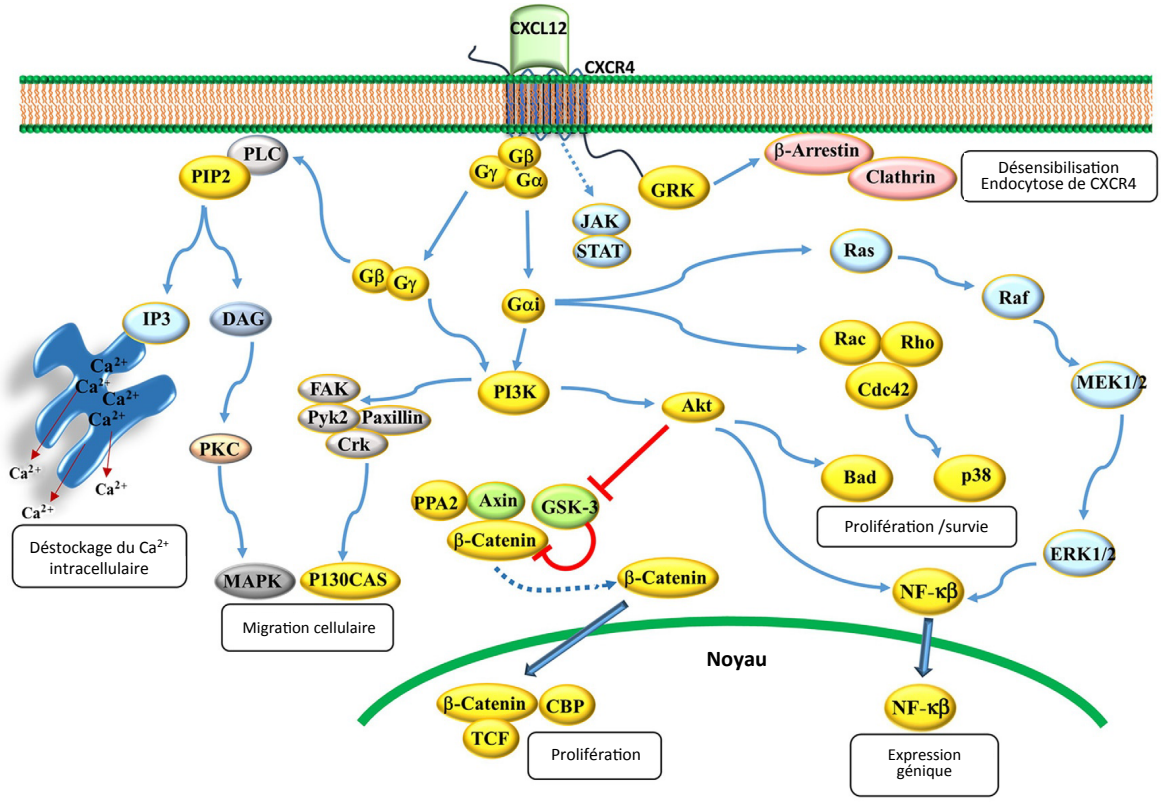


Figure 11 : Voies de signalisation et rôles physiologiques de CXCR4
(Modifiée d'après Chatterjee et coll., Adv Cancer Res. 2014). L'axe CXCL12/CXCR4 conduit à l'activation de plusieurs voies de signalisation, via l'activation des protéines G, elles-mêmes activatrices des voies PI3-Kinase/Akt, phospholipases C/IP3 et Ras-Raf/MAP-Kinase et via les β-arrestines. Ces différentes voies régulent notamment la migration, la survie, la prolifération cellulaire et l'expression de différents gènes.

c. *CXCR7*

CXCR4 a longtemps été considéré comme l'unique récepteur de CXCL12, mais en 2005 un second récepteur nommé RDC1, puis CXCR7 et plus récemment ACKR3, a été découvert (224, 225). Il appartient à la classe des « récepteurs de chimiokines atypiques » ou « *atypical chemokine receptor* » (201). Ces derniers possèdent une structure à 7 domaines

transmembranaires et jouent un rôle dans la capture des chimiokines environnantes (récepteurs leurres, « decoy » ou « scavenger »), mais ne semblent pas signaliser via les protéines $G_{\alpha i}$. CXCR7 possède 2 ligands principaux : CXCL11 et CXCL12. Son affinité pour CXCL12 est 10 fois supérieure à celle de CXCR4 (201, 224, 225). Après fixation de la chimiokine à CXCR7, il l'internalise et l'oriente vers des voies de dégradation. Cette action induit l'apparition d'un gradient de chimiokine, optimisant ainsi les réponses cellulaires induites par CXCR4 (Tableau 4) (226). CXCR7 est également capable de signaliser via les β-arrestines et participe notamment aux processus de croissance, prolifération et survie cellulaire, on parle de récepteur biaisé (214, 215) (Figure 12, Figure 13).

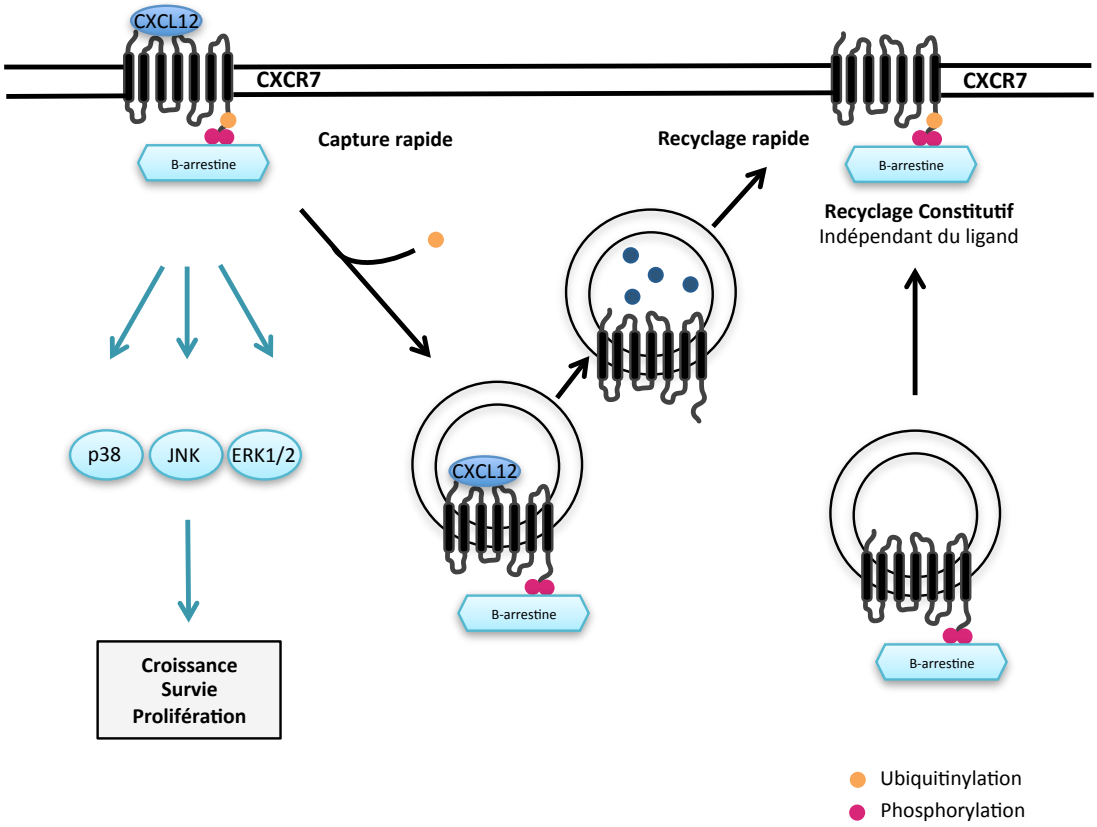


Figure 12 : Voies de signalisation et rôles physiologiques de CXCR7
(Modifiée d'après Freitas et coll., Cytokine Growth Factor Rev. 2014). La fixation de CXCL12 sur CXCR7 induit l'activation de la voie des β-arrestines. Celle-ci contribue à la croissance, la survie et la prolifération cellulaire. CXCR7 participe également à la capture de CXCL12 pour être dégradée dans les compartiments endosomaux. Le recyclage constitutif de CXCR7 à la membrane se fait ensuite, de façon indépendante de son ligand.

Comme pour *Cxcl12* et *Cxcr4*, les souris invalidées pour *Cxcr7* présentent une létalité *in utero*, contrairement aux souris n'exprimant pas Cxcl11, qui elles ne présentent pas de phénotype particulier (227). Ces résultats confirment le rôle majeur du trio dans les phases précoces de développement embryonnaire.

A l'heure actuelle, la plupart des études ont porté sur l'implication de CXCR7 dans les processus pathologiques. Il a néanmoins été montré que CXCR7 était capable de promouvoir un mouvement cellulaire sur les neurones, les lymphocytes B et T (224, 228, 229). Il est également largement exprimé par les cellules endothéliales, régulant ainsi probablement les taux de CXCL12 circulant (230). Les activités homéostatiques de cette protéine sont cependant encore largement à explorer.

Tableau 4 : Nomenclature et fonctions régulatrices clefs des protéines du trio CXCL12/CXCR4-CXCR7

Nom	CD#	Alias	Fonctions régulatrices clefs
CXCL12	-	SDF-1a	Myelopoïèse, lymphopoïèse B, domiciliation des PN et des cellules souches hématopoïétiques
CXCR4	CD184	fusin	Hématopoïèse, organogénèse, immunité adaptative
ACKR3	-	CXCR7 ; RDC1	Développement des valves cardiaques, participe à la génération d'un gradient de CXCL12 pour CXCR4

(Modifié d'après Bachelerie et al. Pharmacol Rev, 2014). CD : clusters de différenciation, PN : polynucléaires neutrophiles.

2) Propriétés oncogéniques

L'implication de l'axe CXCL12/CXCR4-CXCR7 est démontrée dans plus d'une vingtaine de cancers dont les cancers de la prostate, de l'ovaire, du sein, des poumons ou encore du pancréas (231-236). Les protéines CXCL12, CXCR4 et CXCR7 jouent notamment un rôle dans la croissance tumorale, l'angiogenèse et la formation de métastases (236, 237) (Figure 13).

a. CXCL12

Comme nous l'avons vu plus tôt, CXCL12 est exprimée dans un grand nombre de tissus sains (192), mais également à des taux élevés dans différents cancers (236), ou encore au niveau de sites métastatiques préférentiels, tel que le cerveau, la moelle osseuse, les poumons ou le foie (190, 191, 238, 239). Son expression peut notamment être induite par l'hypoxie, qui survient dans les tissus endommagés, mais aussi dans différentes tumeurs, attirant ainsi au niveau des sites hypoxiques des cellules exprimant CXCR4 (194, 240).

La sécrétion de CXCL12 par les cellules stromales du microenvironnement tumoral ou par les organes cibles participe également à l'attraction de cellules tumorigènes sur-exprimant CXCR4, contribuant à la progression tumorale et au développement éventuel de métastases. Cette migration et la diapédèse des cellules exprimant CXCR4 est notamment facilitée par un remodelage du cytosquelette, induit suite à la fixation de CXCL12, assurant une augmentation de la motilité (241-243) et indirectement par l'induction ou l'activation de métalloprotéases matricielles (MMP) (244-247).

CXCL12 est notamment impliquée dans différents cancers viro-induits. Le virus HTLV-1 (Virus T-Lymphotropique Humain de type 1) est associé à des myélopathies et leucémies T de l'adulte. Il a été rapporté sur des lignées cellulaires transformées par ce virus une migration des cellules en réponse à un gradient de CXCL12 (248). L'oncoprotéine Tax produite par ce virus, est également capable d'induire l'expression de CXCL12 par des lignées lymphocytaires T humaines. Ces lignées cellulaires lorsqu'elles sont infectées par HTLV-1 expriment sélectivement cette chimiokine (249). Les papillomavirus humains (HPV), dont les infections sont généralement asymptomatiques, sont responsables de l'apparition de verrues et condylomes et d'une large variété de cancers, dont le cancer du col de l'utérus et certains cancers de la tête et du cou. Les HPV sont eux aussi capables de moduler l'expression de CXCL12, comme le suggère l'absence de détection par immunohistochimie de cette chimiokine au niveau des kératinocytes d'épidermes sains, contrairement à ceux d'épidermes de verrues et condylomes (250). Par ailleurs, les kératinocytes immortalisés par des HPV de types 16 et 18 (responsables de 70% des cas de cancers du col de l'utérus) sur-expriment CXCL12, cet effet étant induit par les oncoprotéines virales E6 et E7 (251). Il est intéressant de noter que la neutralisation de CXCL12 par de la chalcone 4 induit une diminution de la migration de ces cellules. Les Herpesvirus oncogènes modulent également l'expression de cette chimiokine. Le virus EBV, notamment responsable de lymphome de Burkitt et de maladie de Hodgkin, produit le facteur de transcription EBNA3C. Ce dernier induit *in vitro* une surexpression de CXCL12 dans des lignées cellulaires B transformées par EBV. Il favorise la migration des cellules en réponse à un gradient de CXCL12 (252). Une forte expression de CXCL12 dans les carcinomes nasopharyngés induit par l'EBV à un stade avancé a également été rapportée (253). Enfin, CXCL12 semble impliquée dans les cancers induits par HHV-8, comme ceci sera décrit ci-dessous (254, 255).

En cancérologie également, les fonctions de CXCL12 varient en fonction du récepteur et du type cellulaire considérés. Le duo CXCL12/CXCR4 est associé à la prolifération, la survie, la chimiotaxie, l'invasion et/ou l'adhérence de cellules tumorales, notamment dans le cancer colorectal, du foie, du pancréas, le carcinome de la cavité buccale ou encore dans les métastases des cancers de la prostate, du sein, de l'ovaire, du poumon, du pancréas, de la thyroïde, du colon et de la peau (256). Le duo CXCL12/CXCR7, quant à lui, est suffisant pour induire la prolifération et/ou la migration cellulaire et réguler l'angiogenèse dans les

cancers de la vessie, de la prostate, du colon et des poumons (257-261). Il convient donc d'étudier les fonctions tumorales propres à chaque récepteur de CXCL12 (Figure 13).

b. CXCR4

CXCR4 est impliqué dans différentes situations pathologiques. C'est un corécepteur d'entrée du VIH dans les lymphocytes T CD4. Il est également impliqué dans certaines maladies auto-immunes (lupus érythémateux disséminé, polyarthrite rhumatoïde), certains déficits immunitaires rares (Lymphopénie T CD4 Idiopathique, syndrome WHIM), ainsi que dans plus de 23 cancers, tels que les cancers du rein, des poumons, du sein, de la prostate, des ovaires, *etc.* (221, 250, 262-265). Il s'agit du récepteur de chimiokine le plus fréquemment retrouvé sur les cellules cancéreuses humaines et murines (264) (Tableau 5). La surexpression de CXCR4 dans différents cancers et cellules cancéreuses a été décrite dans les carcinomes à cellules rénales, les cellules épithéliales de cancers du sein, de l'ovaire ou encore de la prostate et est considéré comme un facteur de mauvais pronostic (265, 266). Elle peut survenir en réponse à l'effet autocrine et paracrine de différents facteurs, tels que le VEGF et NFκB dans le cancer du sein ou les œstrogènes dans les cancers du sein et de l'ovaire (267-269), ou encore en condition d'hypoxie via le facteur HIF, en présence du facteur von Hippel-Lindau muté (270). Cette surexpression semble corrélée aux phénomènes de croissance tumorale, d'angiogenèse et de métastases ou encore de résistance aux traitements, notamment dans le cancer du sein et de la prostate (271-273). Les cellules cancéreuses exprimant CXCR4 sont pour la plupart capables de migrer en réponse à un gradient de chimiokine CXCL12, à des concentrations comparables à celles nécessaires pour la migration des cellules normales, pouvant ainsi conduire à des métastases de cellules cancéreuses exprimant CXCR4 au niveau des organes exprimant fortement CXCL12 (264). Il a également été rapporté à plusieurs reprises que CXCR4 était surexprimé par les fibroblastes associés aux tumeurs, ceci pouvant également participer à la progression tumorale, l'angiogenèse et l'apparition de métastases (274, 275).

Le couple CXCL12/CXCR4 active différentes voies de signalisations impliquées dans des processus physiologiques et tumoraux. La voie phospholipase C/IP3, est notamment impliquée dans la migration cellulaire, la voie PI3K/AKT, joue elle, un rôle important dans la survie des cellules tumorales, notamment via l'inactivation d'un signal pro-apoptotique agoniste de BCL-2. Le duo participe également à l'activation de la transcription génique, la progression du cycle cellulaire et la prolifération cellulaire via la stabilisation des β-caténines. L'ensemble de ces voies participe donc aux processus tumoraux (265, 276).

Tableau 5 : Expression de CXCR4 dans différents cancers

Cancers	Expression de CXCR4	Récepteur fonctionnel	Régulation de CXCR4
Astrocytome	Augmentée sur les biopsies en fonction du grade de la tumeur. Augmentée dans les cancers par rapport aux sujets normaux	-	-
Cavité buccale	Lignées cellulaires	Oui	-
Cervical	Lignées cellulaires et biopsies	-	-
Colorectal	Lignées cellulaires	Oui	-
Gliome	13/16 lignées cellulaires et biopsies	Oui	-
LAL-B	Forte expression prédictive de l'infiltration d'organes extra-médullaires	Oui	-
LAL-T	Cellules fraichement isolées, biopsies	Oui	
LAM	Uniquement pour les LA myélomonocytaires et les promyélocytaires	Oui	-
LLC-B	Plus élevée que sur les lymphocytes B normaux	Oui	-
LMC	Cellules fraichement isolées	Oui mais moins actif que sur les cellules saines homologues	-
Lymphome folliculaire du centre germinatif	Cellules fraichement isolées	Oui, plus actif que sur les cellules B du centre germinatif	-
Lymphome intraoculaire	Biopsies	-	-
Lymphome non hodgkinien	Principalement sur les biopsies de lymphomes anaplasiques à grandes cellules	-	-
Myélome multiple	Lignées cellulaires	Oui	-
Neuroblastome	Lignées cellulaires	Oui	Expression diminuée par CXCL12
Mélanome	Lignées cellulaires et biopsies	Oui	-
Ovaire	Lignées cellulaires et une minorité des cellules de biopsies	Oui	Expression augmentée par TGF-β
Pancréas	Cellules cancéreuses et cellules endothéliales des vaisseaux sanguins larges	Oui	-
Poumon à petites cellules	Lignées cellulaires	Oui	Coopération entre SCF et CXCL12 pour son activation
Prostate	Cellules cancéreuses, lignées cellulaires et biopsies. Cancers localisés et métastatiques	Oui	-
Rhabdomyosarcome	Lignées cellulaires	Oui	Expression augmentée par le gène PAX3-FKHR
Rein	Lignées cellulaires et biopsies tumorales (ANRm) Augmentée dans les tissus cancéreux par rapport au tissu normal	Oui	-
Sein	Lignées cellulaires et biopsies	Oui	Expression augmentée par VEGF
Thyroïde	Lignées cellulaires	Oui	-

(Modifié d'après Balkwill et coll. Semin Cancer Biol. 2004 et Pitt et coll. Cancer cell 2015 Pitt et coll. Cancer cell 2015 (277)). LLC-B : Leucémie lymphoïde chronique B, LAM : Leucémie aiguë myéloblastique, LAL-B : leucémie aiguë lymphoblastique B, LMC : leucémie myéloïde chronique, ARNm : acide ribonucléique messager. - : non connu

CXCR4 semble également jouer un rôle dans différents cancers viro-induits. Le virus HTLV-1 peut induire une augmentation de la présence de CXCR4 à la surface des cellules infectées ou encore augmenter l'affinité du récepteur pour CXCL12 (248, 278). Les lignées cellulaires T infectées par HTLV-1 expriment également CXCR4, et migrent en réponse à un gradient de CXCL12 (249). Dans un modèle murin de leucémie T de l'adulte induite par HTLV-1, l'utilisation d'un antagoniste de CXCR4 a permis d'inhiber la migration des cellules leucémiques (279). Des résultats comparables ont été observés dans des cellules provenant de patients atteints de ce type de leucémie, mettant en évidence l'implication de l'axe CXCL12/CXCR4 dans le processus de migration cellulaire. Les HPV 16 et 18 sont également capables de moduler l'expression de CXCR4. En effet, l'expression des oncoprotéines E6/E7 dans les kératinocytes immortalisées par ces HPV, sont à l'origine d'une surexpression de CXCL12, mais aussi de CXCR4. L'axe CXCL12/CXCR4 contribue lui même à la migration, la survie et la prolifération de ces cellules (251, 280). CXCR4 est aussi impliqué dans les cancers induits par EBV. Une présence augmentée de CXCR4 à la surface des cellules tumorales a été observée dans un modèle de souris SCID développant un lymphome suite à l'injection intrapéritonéale de CMSP transformées par l'EBV (281). CXCR4 est par ailleurs fortement détecté *in vivo* dans les tissus provenant de patients atteints de carcinome nasopharyngé et est corrélé au potentiel métastatique, comme observé dans des lignées cellulaires métastatiques de ce carcinome (282, 283). Ces effets semblent médiés par la protéine virale LMP-1. Le virus HHV-8 semble également moduler l'expression de CXCR4, mais les données relatives à ses effets sont parfois contradictoires, cela sera décrit ci-après (182, 255, 284, 285).

Globalement, l'implication de CXCR4 dans de nombreux cancers en fait une cible pharmacologique intéressante. De nouvelles thérapeutiques innovantes ciblant ce récepteur sont actuellement à l'essai ou ont déjà reçu une autorisation de mise sur le marché (214, 286). C'est le cas du plerixafor, antagoniste de CXCR4, utilisé dans certains lymphomes ou myélome multiple, en association à un facteur de croissance hématopoïétique, pour la mobilisation des cellules souches hématopoïétiques dans le sang périphérique en vue d'une autogreffe (287, 288). Des données précliniques suggèrent un effet anti-métastatique des antagonistes de CXCR4 (288-291). Cibler l'axe CXCL12/CXCR4 permet d'améliorer la sensibilité à certaines chimiothérapies et immunothérapies. En effet, la mobilisation de cellules leucémiques, depuis les niches de la moelle osseuse, peut potentialiser leur sensibilité aux molécules cytotoxiques, en diminuant les signaux de survie, croissance et résistance

induit par les cellules stromales (292). De même, le microenvironnement tumoral est souvent associé à la présence de molécules immunosuppressives. Dans un modèle d'hépatocarcinome murin, après traitement par sorafenib, le recours au plerixafor prévient la formation de ce microenvironnement et favorise la réponse à un traitement par anti-PD1 (*Programmed Death receptor-1*) (293). Enfin, il a été rapporté dans un modèle murin d'adénocarcinome canalaire pancréatique, que l'administration de plerixafor induit une accumulation rapide des lymphocytes T au niveau des cellules cancéreuses, aboutissant à l'arrêt de la croissance et à l'augmentation de la sensibilité de la tumeur à un anti-PD-L1 (*Programmed cell Death Ligand 1*) (294). Ces composés offrent de nouvelles perspectives thérapeutiques encourageantes dans la prise en charge de certains cancers.

c. CXCR7

CXCR7 est lui aussi exprimé dans un grand nombre de cancers. C'est le cas du cancer cervical, du sein, du poumon, du pancréas, de la prostate, *etc.* (295). Une surexpression de CXCR7 est souvent retrouvée dans les tissus cancéreux en comparaison avec les tissus sains homologues. Il est notamment observé au niveau des astrocytomes ou des glioblastomes qui présentent une surexpression génique de *CXCR7* et une détection plus forte et plus large de la protéine, que celle retrouvée dans le tissu cérébral normal (296). Par ailleurs, CXCR7 est exprimé de façon modéré par les cellules endothéliales des vaisseaux normaux, tandis que son expression est élevée au niveau des vaisseaux associés aux tumeurs, telles que celles du sein ou du poumon (258). Ces observations ont conduit à utiliser CXCR7 comme biomarqueur des vaisseaux associés aux carcinomes rénaux (297). Globalement, la surexpression de CXCR7 est elle aussi corrélée aux principaux processus tumoraux, mais les effets du récepteur sont variables en fonction du type de tumeur (Tableau 6).

Tableau 6 : Impact de CXCR7 dans différents cancers

Cancers	Effets cliniques et biologiques
Cavité buccale	Carcinogénèse
Cerveau	Prolifération, modulation de la migration cellulaire, inhibition de l'apoptose, progression des gliomes. Vascularisation, prolifération des méningiome
Cervical	Croissance de tumeurs agressives, formation de métastases, survie faible
Colorectal	Prolifération, métastases, taille de la tumeur
Foie	Angiogenèse, invasion et métastases, croissance tumorale
Leucémies	Trafic et adhésion cellulaire
Lymphome gastrique du MALT	Associé à des manifestations nodulaires et des stades avancés de lymphomes
Neuroblastome	Migration, métastases
Pancréas	Prolifération
Poumon	Croissance, métastases
Prostate	Prolifération, croissance tumorale, augmentation de l'expression de facteurs pro-angiogéniques : IL-8/CXCL8, VEGF
Rein	Angiogenèse, métastases
Rhabdomyosarcome	Chimiotaxie
Sein	Développement tumoral, Croissance/survie, prolifération, métastases (poumons, cerveau)
Vessie	Expression de facteurs pro-angiogéniques : IL-8/CXCL8, VEGF, survie, prolifération, migration

(Modifié d'après Freitas et al. Cytokine Growth Factor Rev. 2014)

Récemment, notre équipe a publié une revue des connaissances sur l'implication de CXCR7 dans les cancers viro-induits (Annexe 1) (295). Il est ainsi rapporté que ce récepteur est fortement induit par différentes protéines virales. C'est notamment le cas de la protéine Tax du virus HTLV-1 qui est capable d'induire la transcription de *CXCR7* (298). Le récepteur CXCR7 favorise la croissance et la survie de lignées cellulaires leucémiques T de l'adulte, suggérant la contribution du récepteur dans l'immortalisation des lymphocytes T induite par HTLV-1. CXCR7 est également surexprimé à la surface des kératinocytes immortalisés par les HPV 16 ou 18, cette surexpression est dépendante des oncoprotéines E6 et E7 (251). L'utilisation d'ARN en épingle à cheveux spécifiques du gène codant pour CXCR7 est associée à une diminution de la prolifération cellulaire et de l'activation d'Akt, suggérant l'implication de l'axe CXCL12/CXCR7 dans la prolifération et la survie cellulaire de ces kératinocytes. L'expression de CXCR7 est également induite par la protéine EBNA 2 de l'EBV et semble impliquée dans les phénomènes de prolifération et survie cellulaires (299-303). Il a été mis en évidence que l'expression de ce récepteur est nécessaire à la prolifération de cellules issues de lignées lymphoblastoïdes infectées par EBV (301). Enfin, le virus HHV-8 est associé à une surexpression du gène *CXCR7* aboutissant à une croissance, une transformation et une survie cellulaire accrues, comme cela sera détaillé ci-après (103, 104, 304).

Selon les cancers et les types cellulaires, CXCR7 et CXCR4 peuvent-être co-exprimés sur une même cellule ou au contraire exprimés sur des types cellulaires différents (235, 305).

Ces localisations induisent des effets variables : CXCR7 peut notamment réguler la biodisponibilité de CXCL12 dans le microenvironnement de certaines tumeurs, participant ainsi à la croissance et aux métastases de cellules CXCR4 positives (305). Dans d'autres cas l'hétéro-dimérisation de CXCR4 et CXCR7 portés par une même cellule peut induire l'activation de différentes voies de signalisations participant à l'augmentation de la mobilité, de la prolifération et de la survie cellulaire en réponse à CXCL12 et à la formation de métastases (243, 306) (Figure 13).

Selon les cancers et types cellulaires, CXCR4 et CXCR7 peuvent induire des effets additifs, des effets synergiques ou encore des effets antagonistes (233, 243, 307). Dans le cancer du sein par exemple, il semble que CXCR4 joue un rôle dans l'invasion tandis que CXCR7 inhibe cette invasion mais promeut l'angiogenèse et la progression tumorale initiale (233). Dans la leucémie lymphoblastique au contraire, CXCR7 potentialise les effets de CXCR4 (307).

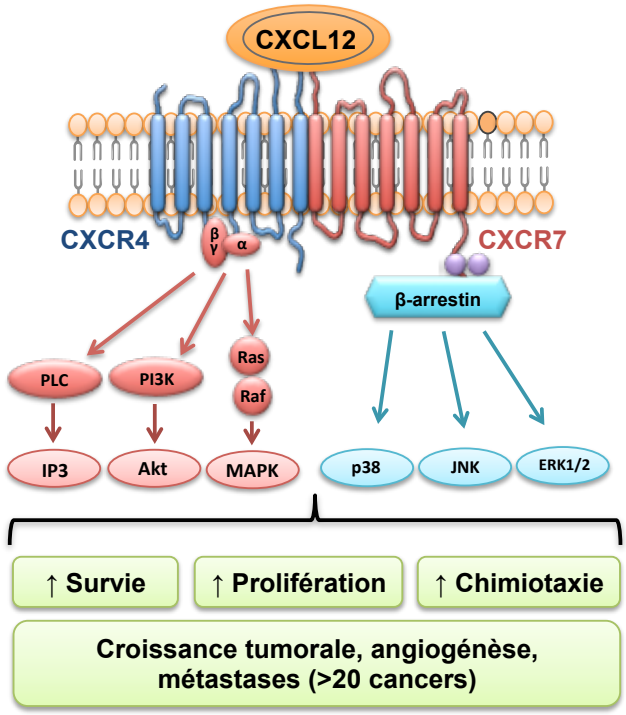


Figure 13 : Implication en cancérologie de l'axe CXCL12/CXCR4-CXCR7
CXCL12 se lie à 2 récepteurs connus : CXCR4 et CXCR7. Ce sont des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G pouvant former des homo- ou des hétéro-dimères. La fixation de CXCL12 sur ces récepteurs induit l'activation de différentes voies de signalisation impliquant la phospholipase C, IP3, Pi3K/Akt, MAPK, ou encore les β-arrestines. Ces dernières jouent un rôle critique dans la survie cellulaire, la prolifération, la chimiotaxie ou encore la séquestration de CXCL12 dans plus d'une vingtaine de cancers.

En synthèse, le trio CXCL12/CXCR4-CXCR7 intervient dans différents cancers et types cellulaires, dont la MK, comme décrit plus en détail ci-après.

3) Implication dans la maladie de Kaposi

Malgré des données de la littérature suggérant l'implication du trio CXCL12/CXCR4-CXCR7 dans la MK, il n'existe que peu de publications sur le sujet et aucune n'a analysé simultanément l'implication des 3 protagonistes.

a. CXCL12

La chimiokine CXCL12 est constitutivement exprimée par les cellules endothéliales des vaisseaux de la peau, les cellules épithéliales des glandes sudoripares, ainsi que les cellules de Langherans et les cellules dendritiques dermiques (Figure 14) (254). Une forte détection de CXCL12 au niveau des SC exprimant LANA à été rapportée par Yao et coll., sur une unique biopsie cutanée (BC) fixée en paraffine, d'un patient ayant développé une MK-VIH (Figure 15) (255). Ce travail indiquait également que les lignées cellulaires HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) ou HDMEC, exprimant CXCL12 à leur surface sont capables d'induire la migration et l'immobilisation de cellules CXCR4 positives à leur surface. Ces fonctions sont abolies en cas d'ajout d'héparinases, capables de dégrader les héparanes sulfates à la surface des cellules, d'un anticorps neutralisant dirigé contre CXCL12 ou de toxine pertussique, inhibant la signalisation de CXCR4 via les protéines Gαi. D'autres études suggèrent une implication de CXCL12 dans le recrutement d'HHV-8 via la constitution d'un gradient de chimiokines. Celles-ci permettraient la migration trans-endothéliale de cellules exprimant CXCR4, tels que les lymphocytes, connus pour être des cellules circulantes infectées par HHV-8 (308, 309).

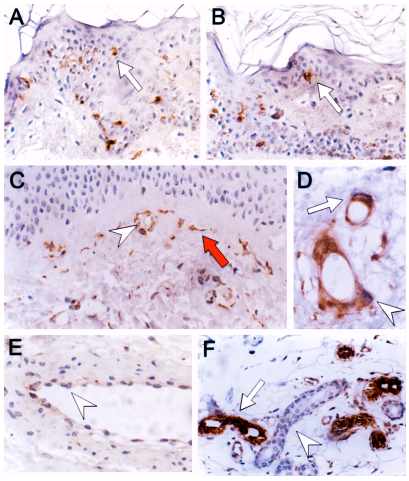


Figure 14 : Détection constitutive de CXCL12 dans la peau
(Modifiée d'après Pablos et coll., Am J Pathol, 1999) A, B : détection de CXCL12 au niveau des cellules de Langerhans (cellules dendritiques de la peau ; flêches). C, D, E : détection de CXCL12 au niveau des cellules endothéliales et des péricytes des vaisseaux sanguins dermiques de petite et grande tailles (flèches et chevrons blancs) et des cellules de Langerhans dermiques (flèche rouge). F : détection de CXCL12 au niveau de certaines cellules des glandes eccrines (flèche blanche), mais cette détection n'est pas uniforme (chevron blanc).

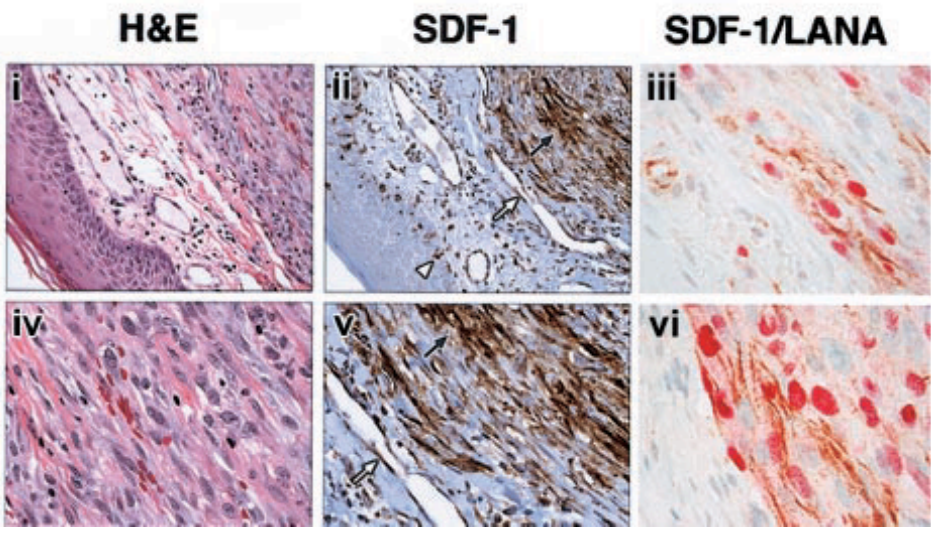


Figure 15 : Détection de CXCL12 dans une biopsie cutanée de MK
(D'après Yao et coll., Blood 2003) i, iv : coloration hématoxyline et éosine (H&E), permettant d'observer une prolifération dermique de vaisseaux fenêtrés et de cellules fusiformes, montrant des globules rouges extravasés. ii, v : Détection intense de CXCL12 au niveau des cellules fusiformes du derme (flèche noire), des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins (flèche blanche) et des cellules de Langerhans (chevron blanc), sur une BC fixée en paraffine d'un patient atteint de MK-VIH. iii, vi : Co-marquage CXCL12 (SDF-1 ; brun) et LANA (rouge) montre que les cellules fusiformes co-expriment le virus sous forme latente (LANA) et CXCL12 (SDF-1).

b. CXCR4

Il existe quatre études portant sur l'implication de CXCR4 dans la MK dont les résultats sont contradictoires.

Wang et coll. ont montré *in vitro* par RT-PCR et cytométrie en flux, sur la lignée cellulaire KS 38, dérivée d'une BC de lésion de MK-VIH, une forte expression de *CXCR4,* avec une détection de la protéine à la membrane des cellules. La stimulation de ces cellules par CXCL12 induit une phosphorylation des protéines Erk et de la MAP Kinase p38 et une activation de c-Jun, AP-1 et NFκB. Par hybridation *in situ,* il ont mis en évidence une forte détection de *CXCR4* sur les BC congelées de 6 patients. Cependant, le statut VIH, le type de MK et de lésions n'étaient pas précisés (Figure 16) (182).

Ces résultats coïncident avec ceux d'Uccini et coll. qui ont décrit une forte expression de *CXCR4* et une intense détection de la protéine sur 6 BC nodulaires congelées de patients atteints d'une MK-classique, non infectés par le VIH (Figure 17) (284)

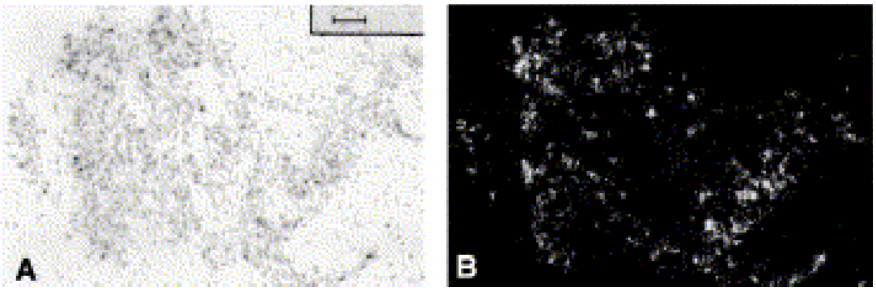


Figure 16 : Expression de *CXCR4* dans six biopsies cutanées de MK
(D'après Wang et coll., BBA, 2004). Expression de *CXCR4* révélée par hybridation in situ (A : points gris, B : points blancs) sur 6 BC congelées de patients atteints de MK. Echelle : 50µm.

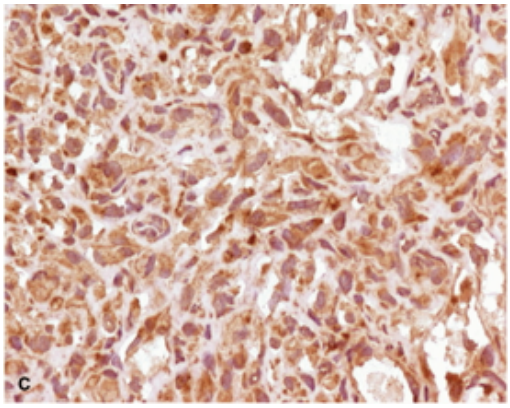


Figure 17 : Détection de CXCR4 sur six biopsies cutanées de MK
(D'après Uccini et coll., Am J Dermatopathol 2003). Détection de CXCR4 par immunohistochimie sur 6 BC nodulaires congelées de patients atteints d'une MK-classique. La quasi-totalité des SC sont marquées par l'anticorps anti-CXCR4.

Yao et coll., en revanche, ont rapporté une détection faible de CXCR4 dans une BC congelée d'un patient atteint d'une MK-VIH, sans que le type de lésion ne soit indiqué, le récepteur n'étant retrouvé que dans quelques cellules mononucléées du derme superficiel (Figure 18) (255). Ces résultats n'étaient cependant pas en cohérence avec l'expression endothéliale connue de CXCR4 (254, 310).

Enfin, Punj et coll. ont étudié l'impact d'HHV-8 sur l'expression de *CXCR4*. Ils ont montré par RT-PCR quantitative sur des HUVEC, que l'infection par HHV-8 induit une diminution de l'expression de *CXCR4,* confirmée par western blot. Des résultats similaires ont été observés avec des HUVEC exprimant la protéine virale vFLIP ou le miARN-146a. Dans des cellules HeLa (provenant de métastase d'un cancer du col de l'utérus), la protéine vFLIP induit une augmentation de l'expression du miARN-146a, via l'activation de la voie NFκB. Dans cette même étude, les résultats ont été approfondis sur des cellules 293T, dérivées de cellules embryonnaires rénales humaines. Dans ces cellules, vFLIP induit l'activation de NFκB, à l'origine d'une activation du promoteur du miARN-146a, contenant lui-même 2 sites

de liaisons pour ce facteur de transcription. Par l'utilisation de différentes lignées cellulaires, les auteurs ont démontré que l'induction du miARN-146 par vFLIP, induisait des modifications post-transcriptionnelles de *CXCR4*. Enfin, les auteurs ont observé par RT-PCR quantitative une diminution de l'expression de *CXCR4* et une augmentation du miARN-146a dans six BC de MK par rapport à dix biopsies de peaux saines. Là encore, le statut VIH, le type de MK, le type de lésions, le type biopsie et le statut immunovirologique des donneurs sains et le mode de conservation des BC n'étaient pas connus (Figure 19) (285).

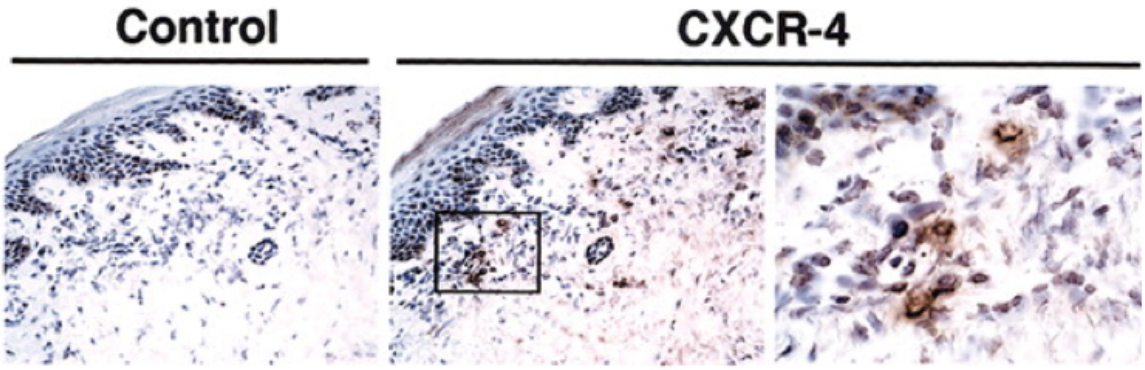


Figure 18 : Détection de CXCR4 dans une biopsie cutanée de MK
(D'après Yao et coll., Blood 2003) Seules quelques cellules dispersées dans le derme superficiel sont marquées par l'anticorps anti-CXCR4 dans une BC de patient atteint d'une MK-VIH (type de lésion inconnu).

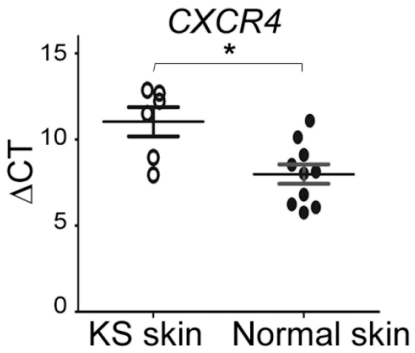


Figure 19 : Expression de *CXCR4* diminuée par HHV-8 *in vitro*
(D'après Punj et coll., Oncogene, 2010) Diminution de l'expression de *CXCR4* dans six BC de MK par rapport à dix biopsies de peaux saines. Analyse par RT-PCR semi-quantitative (ΔCT : représente la quantité de transcrit *CXCR4* rapportée à celle du gène de ménage de la β-actine. Plus le ΔCT est élevé, moins l'expression du gène est importante).

Les conclusions de ces 4 travaux portent principalement sur l'étude *in vitro* de l'expression de CXCR4 dans des cellules issues de lignées cellulaires (HUVEC ou HDMEC) infectées par HHV-8. Le faible nombre d'échantillons humains utilisés dans ces publications, ainsi que l'absence de précision du type de lésions, et l'absence de données épidémiologiques concernant les patients rendent l'interprétation des données difficile.

c. *CXCR7*

En 2002, 2 équipes ont étudié *in vitro* les modifications d'expression génique de *CXCR7* induites suite à l'infection de DMVEC (*Dermal Microvascular Endothelial Cells)* immortalisées par HHV-8 (103, 304). Ces 2 études ont rapporté une forte augmentation de l'expression de *CXCR7* dans ce modèle. Par la suite, Raggo et coll. ont confirmé dans des DMVEC que *CXCR7* était le gène le plus fortement induit par HHV-8 (104). Ce gène semble jouer un rôle transformant sur les DMVEC, qui adopte une morphologie fusiforme suite à l'induction de son expression. L'utilisation de petits ARN interférants ou de molécules anti-sens dirigés contre CXCR7, dans ces cellules induit une inhibition de la prolifération cellulaire et de l'acquisition d'une morphologie fusiforme par les cellules (Figure 20A). Au contraire, la transfection de *CXCR7* dans des lignées cellulaires NIH 3T3 induit une augmentation de la prolifération cellulaire et l'injection sous-cutanée dans des souris nude de ces cellules NIH 3T3 sur-exprimant CXCR7, conduit à l'apparition de tumeurs volumineuses (104). Enfin, dans cette même étude, l'analyse par PCR quantitative de deux lésions de MK-VIH, dont le statut immunovirologique et l'éventuel traitement ARV des patients n'étaient pas indiqués, rapporte une surexpression de *CXCR7* par rapport à des DMVEC non infectées (Figure 20B).

Le faible nombre d'échantillons rend de nouveau l'interprétation des résultats de cette étude, publiée en 2005, difficile. A cette époque, CXCR7 n'avait pas encore été caractérisé comme le second récepteur de CXCL12 (224). A cet égard, des investigations supplémentaires semblent justifiées.

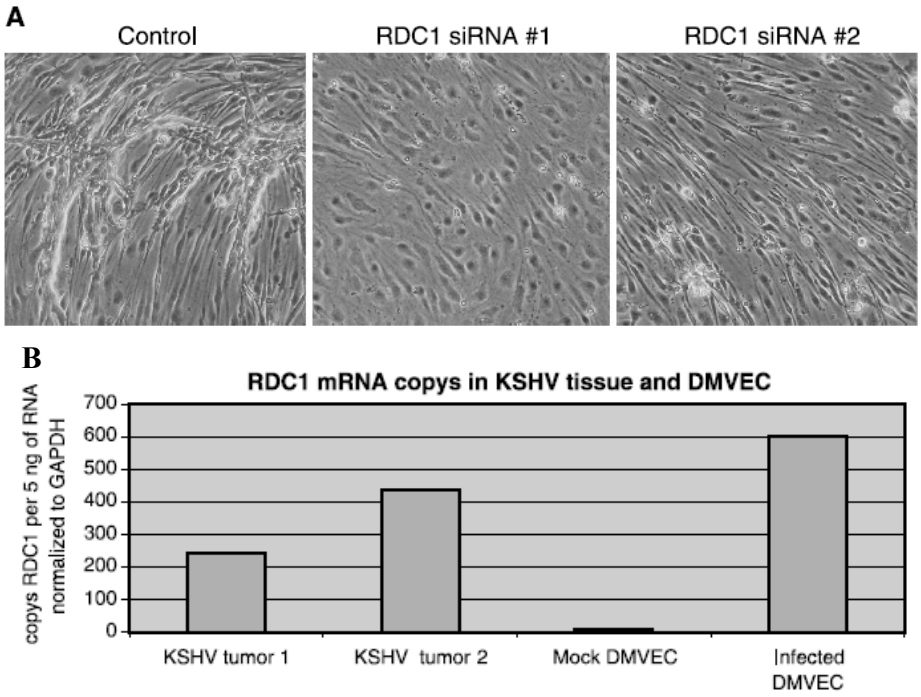


Figure 20 : Pouvoir transformant de *CXCR7* et surexpression dans 2 biopsies cutanées de MK-VIH
(Modifiée d'après Raggo et coll., Cancer Res, 2005) A : Control : après infection de DMVEC in vitro par HHV-8, les cellules prennent un aspect fusiforme. RDC1 siRNA#1 et RDC1 siRNA#2 : le blocage de l'expression de *CXCR7 (RDC1)* par un petit ARN interférant (siRNA, 2 différents testés) dans des DMVEC infectées, leur fait perdre leur aspect fusiforme. B : surexpression de *CXCR7* dans 2 BC de patients atteints de MK-VIH, tout comme dans les DMVEC infectées par HHV-8 au contraire des DMVEC non infectées (Mock DMVEC). siRNA : petit ARN interférant, qRT-PCR : réaction de polymérisation en chaîne quantitative après reverse transcription.

A la lumière de la littérature, le faible nombre d'études, leurs résultats contradictoires, l'absence d'analyse simultanée des protéines du trio, le faible nombre de patients inclus dans chaque analyse, l'absence de données exhaustives sur le type de lésions étudiées et le statut immunovirologique des patients (VIH, HHV-8), sont autant d'arguments justifiant de nouvelles études, afin d'étayer le rôle très probable de l'axe CXCL12/CXCR4-CXCR7 dans la pathogénèse de la MK.

3) La maladie de Kaposi liée au VIH

A. Epidémiologie

La MK est le premier cancer rapporté dans la cohorte FHDH ANRS CO4 sur la période 1992-2009 (9), le second rapporté dans l'étude ONCOVIH décrivant la distribution des nouveaux cas de cancers en France en 2006, chez les patients infectés par le VIH (1), tout comme dans la *HIV/AIDS Cancer Match Study*, examinant le risque de cancer chez les personnes infectées par le VIH aux Etats-Unis, sur la période 1996-2010 (311).

Selon les 2 principales classifications internationales du *Center for Diseases Control* (CDC, Atlanta, USA) et de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS, Genève, Suisse), l'apparition d'une MK chez un patient VIH est suffisante pour classer les patients au stade SIDA (312, 313).

1) Séroprévalence du virus HHV-8 chez les patients infectés par le VIH

L'infection par HHV-8 est hautement corrélée à celle par le VIH, à la fois chez les femmes, les hommes hétérosexuels et les HSH (314). Comme dans la population générale, des disparités de séroprévalence existent chez les patients VIH. Les taux de séropositivé pour HHV-8 différent notamment en fonction du sexe et des pratiques sexuelles. Il a par exemple été montré que 6% des femmes incluses dans la *AIDS Cancer Cohorte* présentaient des anticorps anti-HHV-8, contre 13% des hommes hétérosexuels et 30% des HSH (315). Ces données corroborent celles obtenues dans une cohorte d'HSH du *National Institutes of Health* (NIH), dans laquelle 25% des HSH présentent une séropositivité pour HHV-8 ; parmi eux 78% étaient co-infectées par le VIH (316). Les patients hémophiles VIH présentent, eux aussi une disparité de séroprévalence, tout comme les utilisateurs de drogues par voie intraveineuse (UDIV), avec 18% des femmes, 14% des hommes hétérosexuels et 44% des HSH, VIH, UDIV présentant des anticorps anti-HHV-8 dans une cohorte suivie à San Francisco (317, 318). Il existe donc une incidence disproportionnée d'infection par HHV-8 dans la population VIH, homo ou bi-sexuelle, masculine (123).

Contrairement aux autres populations, chez les patients VIH, la séroprévalence d'HHV-8 est très élevée quelle que soit la zone de résidence, à forte, moyenne ou faible incidence. En Afrique, tout d'abord, il a été rapporté chez des patients VIH des séroprévalences pour HHV-8 de 48% en Afrique du Sud, 51% en Zambie et 56% en Ouganda, proches de celle retrouvée dans la population générale (319-321). Dans les zones de plus faible prévalence en revanche, la proportion de patients VIH, présentant des anticorps anti-HHV-8, dépasse largement celle des patients non infectés. Aux Etats-Unis, par exemple, dans une cohorte de militaires récemment infectés par le VIH, 32% étaient immunisés contre HHV-8 (37), de même pour 37% des patients VIH d'une cohorte italienne (60% des HSH inclus dans cette étude) (322). En Espagne, ces mêmes disparités ont été retrouvées, avec plus de 86 % des HSH VIH immunisés, contre 28% des HSH non infectés par le VIH et 6,5% des donneurs de sang (323). Enfin, une étude multicentrique européenne a rapporté une séroprévalence de 72% chez les patients HSH VIH (324).

2) Facteurs de risque et modes de transmission d'HHV-8

Cette séroprévalence augmentée dans la population VIH, notamment chez les HSH, suggèrent des facteurs de risque de transmission différents en fonction des populations. Chez les HSH par exemple, des études menées aux États-Unis ou en Europe ont montré que le nombre total de partenaires sexuels, ou le nombre de partenaires au cours des 6 derniers mois et la présence d'autres infections sexuellement transmissibles, tels que le virus de l'hépatite B ou HSV-2 étaient associés à un plus haut risque d'infection par le virus HHV-8 (35-37, 324). En revanche, la séroprévalence d'HHV-8 ne semble pas influencée par l'infection par le virus de l'hépatite C, quelle que soit la sous-population étudiée (37). Au contraire, les pratiques sexuelles, l'infection par le virus de l'hépatite B et HSV-2, ne semblent pas être des facteurs de risques de transmission chez les hétérosexuels VIH, contrairement au statut marital de célibataire ou de polygame (37, 321).

En ce qui concerne la transmission parentérale chez les patients VIH, il semble que la durée d'utilisation de drogues par voie IV augmente le risque de transmission. En effet, les femmes UDIV et les HSH UDIV depuis plus de 30 ans et les hétérosexuels UDIV depuis plus de 40 ans présentent un plus fort risque de séroconversion que leurs homologues UDIV depuis moins de 10 ans (314). Ces résultats suggèrent cependant une transmission par voie parentérale rare, tout comme la faible séroprévalence d'HHV-8 chez les patients hémophiles infectés ou non par le VIH (317, 318).

Le tabac et l'alcool pourraient également influer, négativement pour le 1er et positivement pour le second, le risque de transmission du virus chez les patients VIH (315).

La disparité d'incidence observée chez les patients VIH HSH, notamment avec un nombre de partenaires sexuels élevé, ou chez les hétérosexuels polygames ou célibataires, par rapport aux patients hétérosexuels mariés, ou aux patients infectés par voie parentérale, tels que les hémophiles et les UDIV est en faveur d'une transmission par voie sexuelle dans cette population (123, 325). Dans des analyses univariées chez des patients HSH, VIH, européens, il a été montré que l'ensemble des pratiques sexuelles non protégées étaient à risque de transmission d'HHV-8 (324). Malgré la transmission sexuelle très probable, les résultats concernant les voies de transmissions spécifiques restent contradictoires, notamment en ce qui concerne la voie oro-anale, ano-génitale et oro-génitale (26, 324, 326).

3) Incidence de la maladie de Kaposi liée au VIH

Comme nous l'avons vu précédemment, les zones à forte incidence d'infection par le VIH et HHV-8 présentent également un nombre important de cas de MK-VIH (61). Dans une

étude multicentrique menée en Côte d'Ivoire et au Bénin, la MK était le deuxième cancer rapporté chez les patients VIH et ce cancer était fortement associé à la présence du VIH (OR = 62,2) (Figure 21) (327). Des résultats comparables ont été publiés en Afrique du Sud et en Ouganda (328-330). Quoi qu'il en soit, ces études ont été réalisées avant l'utilisation des ARV, ou dans des régions où moins de 20% des patients recevaient des ARV.

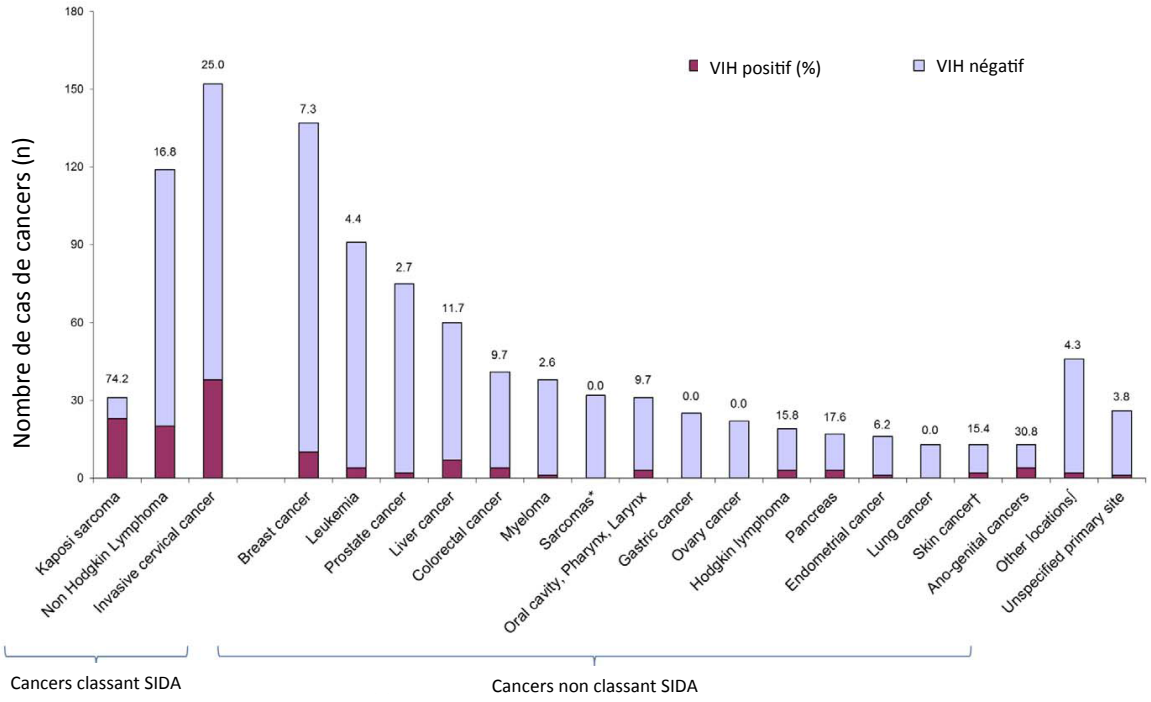


Figure 21 : Distribution des cas de cancers en fonction du site et du statut VIH, en Côte d'Ivoire et au Bénin (Modifiée d'après des Tanon A. et coll. PLoS One. 2012). Patients (n=1017) issus de la collaboration WADA (*West Africa Data Base on Antiretroviral Therapy*) sur la période 2009-2011. *Hors MK, †Sauf mélanome, ∫ Other locations : inclus œsophage (n = 10), vésicule biliaire et voies biliaires (n = 8), tumeurs endocrines (n = 9) et autres types de cancers mineurs (n = 20).

Dans une étude menée aux Etats-Unis, parmi les cas de cancers déclarés en 2010 chez les patients VIH, un excès de MK de 100% était retrouvé dans cette population par rapport à la population générale, malgré l'accès aux ARV (126). Toujours dans ce pays, plusieurs études ont rapporté une large diminution du nombre de cas de MK-VIH entre la période 1991-1995 (pré-ARV) et la période 2000-2005 (post-ARV), passant de plus de 21 000 cas à moins de 4 000 entre ces 2 époques et d'une incidence de 185 cas pour 100 000 personnes-année, à 62 (331, 332).

Les études menées en Europe rapportent le même type de résultats. La MK représente également l'un des cancers les plus fréquemment retrouvés chez les patients VIH, avec le lymphome non Hodgkinien (333). Le risque cumulé de développer une MK après 15 ans de suivi pour un patient VIH est de 6,1% et le ratio standardisé d'incidence normalisé sur l'âge et le sexe est largement influencé par la prise ou non d'ARV (ratio de 120 contre 548

respectivement). En France plus particulièrement, les données obtenues via la cohorte FHDH ANRS CO4 ont confirmé la diminution importante de l'incidence de la MK-VIH entre 1992 et 2009, avec malgré tout un risque persistant supérieur à celui de la population générale, malgré la prise d'ARV et une reconstitution immune appropriée (taux de CD4>500/mm^3) (Figure 22) (125). Cette étude renseigne par ailleurs sur l'incidence dans les différentes populations infectées. Comme escompté, les HSH représentent le groupe le plus à risque avec un excès d'incidence de 286 pour 100 000 patients-années, contre 105 pour les hommes hétérosexuels et 59 pour les femmes. De même, le risque de développer une MK chez les hémophiles VIH estimé en 1990 par le CDC était de seulement 1% par rapport à 21% chez les HSH (123). Enfin, de nouveau dans la cohorte FHDH ANRS CO4, la survie des patients développant une MK-VIH avait progressée entre la période 1992-1996 et la période 1997-2000 (9). Sur l'intervalle 2005-2009, les survies à 5 ans des patients, avec et sans atteinte viscérale, étaient respectivement de 83 et 92 %.

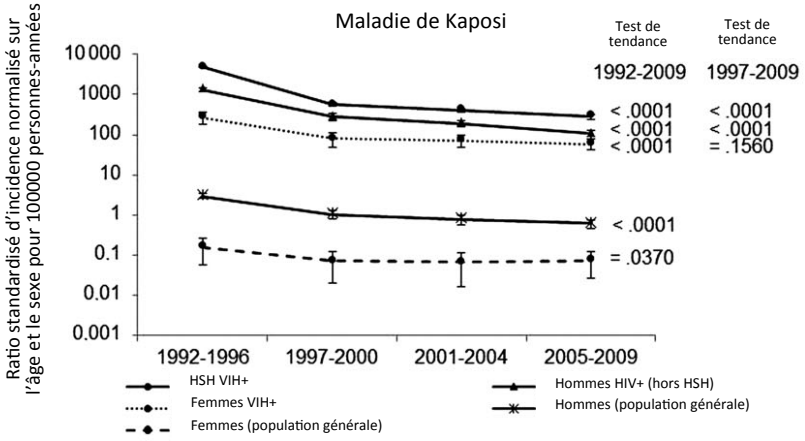


Figure 22 : Ratio standardisé d'incidence de la MK chez les patients infectés par le VIH et dans la population générale, par période calendaire

(Modifié d'après Hleyhel et coll., Clin Infect Dis 2013). Les HSH VIH reste le groupe le plus à risque de MK-VIH, quelle que soit la période calendaire. L'incidence de la MK-VIH a diminué de façon significative entre les périodes pré-ARV (1992-1996) et post-ARV (1997-2009) (P<0.0001) et a continué de diminuer après l'arrivée des ARV.L'incidence de la MK reste plus élevée dans la population VIH, par rapport à la population générale, quel que soit le sous-groupe considéré.

Globalement les résultats à l'échelle mondiale, montrent que les ARV exercent un effet protecteur à la fois sur la survenue et la mortalité de la MK chez les patients VIH, mais ces derniers conservent un risque majoré, notamment en cas d'immunité de CD4<200/mm^3 ou de nadir de CD4 bas (9, 324).

B. Rôle du VIH

Les Herperviridae sont responsables d'infections opportunistes, en particulier le Cytomegalovirus (rétinite, colite, etc.), l'EBV (lymphoprolifération B) et HHV-8 (MK,

maladie de Castleman, lymphome des séreuses) (334). Une synergie entre ces virus existe, résultant à la fois de modes de transmission identiques, d'épidémiologies proches, mais aussi d'interactions physiopathologiques directes (335). Suligoi et coll. ont rapporté que l'infection par HHV-8 était significativement associée à une progression vers le stade SIDA chez les patients VIH. Cette étude montre également que l'infection concomitante par 4 types d'Herpesvirus différents augmente le risque d'évoluer vers le stade SIDA (322). Une étude sur la santé des hommes à San Fransisco, menée entre 1984 et 1994, a montré que 29% des patients VIH ont développé une MK-VIH, tandis qu'aucun patient non infecté par le VIH mais par HHV-8 n'a développé la pathologie (35). Enfin, une étude longitudinale menée aux Etats-Unis en 1996 auprès de 400 HSH a mis en évidence qu'une infection par HHV-8 postérieure à celle par le VIH induisait un sur-risque de développer une MK (OR : 2.55) (128). Ces résultats corroborent l'implication de l'infection par le VIH dans le développement de la MK et la coopération entre les 2 virus.

L'immunosuppression conférée par le VIH, mais aussi l'activation immune chronique induite par ce dernier contribuent au développement de la MK (174). Par exemple, la MK-VIH est une manifestation classique en cas de syndrome inflammatoire de reconstitution immune chez les patients VIH (336-338) et le risque de développer une MK-VIH est augmenté dans les premiers mois de traitement ARV, probablement en raison du phénomène de reconstitution immunitaire (339). Le VIH contribue donc au développement de la MK notamment via la production de cytokines immunomodulatrices, de récepteurs et de facteurs de croissance, tels que le TNF-α, L'IL-1ß, l'IL-8 ou encore l'IL-6 (171). Les virus HHV-8 et VIH créent un microenvironnement inflammatoire favorisant la prolifération et la transformation des cellules endothéliales en SC, la formation de néovaisseaux fenêtrés et le recrutement de lymphocytes et monocytes au sein des lésions, ce qui aboutit à la dissémination d'HHV-8 et à un cancer multicentrique angio-prolifératif (308) (Figure 9).

La protéine Tat du VIH, impliquée dans la transcription du virus, semble participer activement au processus tumoral. Elle contribue notamment à la prolifération des SC et des cellules endothéliales activées par des cytokines pro-inflammatoires (131, 340), mais aussi à l'angiogenèse, notamment via la libération du bFGF lié aux héparanes sulfates (341, 342) et à la survie des cellules endothéliales via l'induction du facteur anti-apoptotique BCL-2 (133). Elle intervient également dans la progression de la MK par induction de l'expression de MMP, elles-mêmes à l'origine d'une augmentation de la perméabilité des vaisseaux et de l'invasion des SC (343). De plus, Tat induit l'expression de CXCR4 à la surface des lymphocytes T CD4, ceci pourrait donc contribuer au recrutement de ces cellules au niveau

des sites riches en CXCL12 (344). Les souris transgéniques Tat_{86}, exprimant la protéine Tat, développent des lésions tumorales ressemblant à des lésions de Kaposi, composées de cellules fusiformes, exprimant la protéine Tat et accompagnées d'un important infiltrat inflammatoire (345). La présence de la protéine Tat dans les formes de MK-VIH pourrait donc expliquer la plus forte agressivité de cette forme clinique, par rapport à la MK-classique (340).

Il existe également une coopération directe entre les 2 virus. En présence de la protéine Tat par exemple, LANA peut activer les régions LTR du VIH-1, contenant les principaux éléments promoteurs de la transcription du VIH-1. Ainsi LANA contribue à une augmentation de la réplication du VIH (346). *In vitro,* la protéine Tat, quant à elle, est capable d'induire une augmentation du nombre de copies d'HHV-8 dans les lignées B de lymphome de BCBL (*body cavity-based lymphoma*), ainsi que dans les CMSP de patients atteints de MK-VIH, ou VIH non atteints de MK, ou encore transplantés rénaux, VIH négatifs, non atteints de MK (347). Cette protéine induit également l'expression de gènes lytiques d'HHV-8, notamment le vRCPG, dont l'expression est plus élevée dans la forme MK-VIH que dans la MK-classique (348). Il semble aussi exister un effet synergique entre le vRCPG et Tat aboutissant à une augmentation de l'activation de voies de signalisation impliquées dans la physiopathologie de la MK (NFκB, NFAT, *etc.*) (349).

A la lumière de ces données, il est possible de conclure que l'infection par le VIH constitue un facteur de risque indépendant de développement de la MK, en coopérant avec HHV-8 dans la physiopathologie de la maladie et contribuant au phénotype particulièrement agressif de la forme MK-VIH.

C. Prise en charge thérapeutique

1) Stratégie thérapeutique actuelle

a. Les antirétroviraux

Comme indiqué précédemment, l'apparition des associations antirétrovirales a profondément modifié l'histoire naturelle et le pronostic de la MK. Outre l'impact positif sur la prévalence de cette maladie, il a également été observé une diminution de la taille et du nombre de lésions, en l'absence de chimiothérapie, chez les patients sous ARV (350, 351). La mise sous ARV constitue donc le traitement de première intention chez tout patient développant une MK-VIH (352). En effet un traitement efficace permet l'obtention d'une rémission complète des lésions chez plus de 50% des patients (353).

L'association de plusieurs classes d'ARV est donc indispensable dès le diagnostic de MK chez un patient infecté par le VIH. Le choix des différentes classes thérapeutiques, dans cette indication reste controversé. Certains auteurs conseillent l'utilisation systématique d'un inhibiteur de la protéase (IP) dans les trithérapies (354, 355), du fait de leurs propriétés *in vitro* anti-angiogéniques, anti-inflammatoires et anti-tumorales, pouvant contribuer à la régression de la MK (355-358).

D'autres équipes en revanche ont rapporté que les combinaisons antirétrovirales comportant un IP étaient équivalentes à celles comportant un inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse (INNTI) sur la MK. L'efficacité anti-tumorale semblant principalement liée au contrôle de la réplication du VIH (359, 360). Par ailleurs, une étude prospective menée chez des patients atteints de MK-VIH a montré qu'un traitement ARV comportant des IP ou des INNTI pouvaient, tous deux, induire la négativation de la CV HHV-8 (361).

Le risque d'aggravation de la MK, après mise sous ARV des patients, existe cependant. Ce dernier est lié à un syndrome de reconstitution immunitaire ou *Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome* (IRIS), survenant principalement dans les premières semaines suivant la mise sous traitement, notamment chez des patients dont le taux de lymphocytes T CD4 est très bas (336, 362). L'IRIS apparaît de façon paradoxale après diminution de la charge virale VIH et augmentation des lymphocytes T CD4 circulants. Il est lié à la restauration d'une immunité dirigée contre un pathogène opportuniste et notamment à la présence de lymphocytes T CD4 mémoires très activés, exprimant des marqueurs de type PD1 et produisant de l'IFN-γ (363, 364). La physiopathologie de l'IRIS dans le cas de la MK n'est pas parfaitement élucidée, mais il semble que sa survenue soit associée à une dérégulation de l'immunité et à une réponse inflammatoire exacerbée dirigée contre HHV-8. Cette dernière s'accompagne de cytokines pro-inflammatoires de type Th1 pouvant réactiver HHV-8 et permettre la dissémination du virus, notamment via l'induction de MMP (336, 365). L'association des ARV à des chimiothérapies cytotoxiques en cas de survenue ou d'aggravation d'une MK liée à un IRIS, permet de limiter très largement la mortalité liée à ce syndrome (366). De même dans les formes rapidement progressives, avec atteintes cutanéo-muqueuses ou viscérales, l'association des ARV aux autres types de traitements reste indispensable (367). En effet, une revue de la Cochrane Library a montré que les associations ARV-chimiothérapie(s) étaient plus efficaces que les ARV seuls, dans la réduction de la progression des formes sévères ou évolutives de MK-VIH (368). Cependant, chez les patients recevant ces associations, la présence d'interactions médicamenteuses peut complexifier leur

prise en charge. En effet, les IP et les INNTI sont des substrats mais aussi des inhibiteurs et/ou des inducteurs puissants des cytochromes P450 (CYP) et de la glycoprotéine P (Pgp). De nombreux anticancéreux sont également métabolisés par le système du CYP, leur administration concomitante avec les ARV peut donc aboutir à leur accumulation et une toxicité exacerbée, ou encore à une diminution de l'efficacité d'une ou des deux classes médicamenteuses (369). Les principales interactions entre les ARV et les molécules communément utilisées dans la prise en charge de la MK seront discutées ci-après.

En dehors des ARV, les traitements locaux et généraux gardent donc leurs indications, d'ordre esthétique pour les premiers et dans les formes graves avec engagement du pronostic fonctionnel ou vital pour les seconds, notamment en cas d'inefficacité des ARV ou d'IRIS (2, 370-373).

b. Traitements locaux

Dans les formes cutanées et/ou localisées de la MK, les traitements locaux sont utilisés. Ils ont l'avantage d'être bien tolérés et d'éviter les complications liées aux traitements par voie générale. On distingue :

- L'exérèse chirurgicale : qui permet l'excision des lésions dans un but diagnostique et cosmétique. Elle doit être réservée aux formes pauci-lésionnelles, le risque principal étant la récidive sur la cicatrice due à un phénomène Koebner (374).

- La cryothérapie : consiste à appliquer de l'azote liquide sur les lésions. Elle est souvent réservée aux lésions infracentimétriques ou aux lésions palpébrales. Ce traitement permet une réponse partielle ou complète au niveau de la lésion traitée dans environ 70 % des cas (375, 376). Cependant, cette technique est douloureuse, peut induire des hypopigmentations et n'est utilisable que pour des lésions de petites tailles (377).

- Le traitement par laser : peut être utilisé dans la prise en charge de lésions cutanées ou muqueuses (378).

- La radiothérapie : est utilisée pour contrôler de façon temporaire des lésions cutanées plantaires et douloureuses dans l'attente de l'efficacité des traitements généraux. Le pourcentage de rémission partielle ou complète au niveau de la lésion traitée est supérieur à 80%. (379, 380).

- La chimiothérapie intra-lésionnelle : utilisant la vinblastine, la vincristine ou la bléomycine, permet d'éviter les effets indésirables des chimiothérapies par voie systémique et d'obtenir des taux de réponses partielles ou complètes de l'ordre de 60 à 98% sur les formes

cutanées pures (381, 382). Néanmoins, l'effet est limité, avec un pourcentage élevé de récidive à moyen terme.

- L'alitrétinoïne est un rétinoïde approuvé dans le traitement topique des lésions cutanées de MK. Son efficacité a été étudiée dans 2 essais cliniques en double aveugle et a montré une réponse de l'ordre de 30% (383).

Dans les formes cliniques de MK engageant le pronostic fonctionnel ou vital (formes cutanéomuqueuses évolutives +/- atteintes viscérales) le recours à des traitements généraux s'impose.

c. Traitements généraux

Les traitements généraux sont habituellement réservés aux formes disséminées, symptomatiques ou rapidement progressives. On distingue l'immunothérapie, les mono et les polychimiothérapies cytotoxiques, faisant appel à des molécules non sélectives telles que l'IFN-α recombinant ou des chimiothérapies cytotoxiques : bléomycine, vincristine, vinblastine, anthracyclines (daunorubicine, doxorubicine), taxanes (docétaxel, paclitaxel) (2, 371, 384-386).

L'immunothérapie

L'immunothérapie est basée sur l'utilisation d'IFN-α, une cytokine présentant des effets pléïotropes sur le système immunitaire, la prolifération cellulaire, l'apoptose, l'angiogenèse et possédant des propriétés antivirales (387-390).

L'IFN-α exerce, notamment *in vitro*, des effets anti-réplicatifs sur le VIH-1 et inhibe la réactivation d'HHV-8 (391-393). Son efficacité *in vivo* a aussi été démontrée sur le VIH-1 dans des essais cliniques de phase II (390, 394, 395) et est autorisée pour le traitement de la MK, exceptée la MK-iatrogène en raison du risque de rejet (396). Environ 30% à 50% des patients répondent favorablement à l'IFN-α selon les études (373, 377). Les réponses sont meilleures chez les patients présentant un taux de lymphocytes T CD4 supérieur à 200/mm^3, ou recevant des doses élevées d'IFN-α (397, 398). Par ailleurs, l'association ARV-IFN-α est synergique, probablement en raison des effets antiviraux de l'IFN-α, permettant une diminution des doses utilisées et par conséquent des effets indésirables de la molécule (399, 400). La fréquence des injections et la présence d'effets indésirables dose-dépendants importants à type syndrome pseudo-grippal, leuco-neutropénie, troubles neurologiques ou induction de certaines maladies auto-immunes limitent cependant l'utilisation de cette molécule (387, 401). Néanmoins, la disponibilité d'une forme pégylée de l'IFN-α, en

association avec un traitement ARV a permis de réduire la fréquence des injections, comme les doses d'IFN-α et a démontré une utilité dans la prise en charge de patients réfractaires (402).

Les chimiothérapies

Les molécules cytotoxiques le plus souvent utilisées dans la MK sont la bléomycine, la vinblastine, la vincristine, la daunorubicine, la doxorubicine liposomale, le docétaxel et le paclitaxel. Des réponses cliniques sont habituellement observées en 12 semaines, mais les rechutes à l'arrêt du traitement sont fréquentes, notamment en l'absence de reconstitution immunitaire et imposent la plupart du temps un traitement d'entretien (71).

La bléomycine et la vinblastine sont les 2 molécules les plus utilisées en monochimiothérapie. La bléomycine peut être employée en ambulatoire et permet un taux de réponses partielles ou complètes de l'ordre de 50 à 70%. La vinblastine présente une efficacité voisine (403, 404).

Les formes liposomales pegylées de doxorubicine et daunorubicine, deux anthracyclines, ont également obtenu une autorisation d'utilisation dans des stades avancés de MK-VIH. En effet, dans différentes études comparatives menées chez des patients atteints de cette forme de MK, les formes liposomales se sont avérées aussi efficaces, en monothérapie, que les polychimiothérapies, incluant adriamycine-bléomycine-vinca-alcaloïdes ou bléomycine-vinca-alcaloïdes (405-409). Ces formes galéniques permettent de modifier la pharmacocinétique des produits en protégeant la molécule de dégradations prématurées, résultant en une augmentation de la demi-vie, une meilleure localisation de la tumeur, une meilleure efficacité et une diminution de la toxicité (405, 406). Ces traitements sont indiqués dans les formes résistantes aux autres monochimiothérapies ou dans les formes œdémateuses.

D'autres cytotoxiques ont été évalués dans des essais cliniques de phase II ou sur de petites cohortes de patients. C'est le cas de la gemcitabine, du paclitaxel ou de l'irinotécan (410-413). Les principales études analysant les résultats et effets secondaires des monochimiothérapies utilisées dans la MK sont présentées dans le Tableau 7.

Tableau 7 : Efficacité et effets indésirables des principales monochimiothérapies utilisées dans la prise en charge de la MK

Traitement	Nombre de patients	Réponse globale (% de réponses partielle et complète)	Durée médiane de réponse	Effets secondaires fréquents (>30%)
Bléomycine	60	48	37 semaines	Fibrose pulmonaire, fièvre, frissons
Bléomycine	70	74	20 semaines	
Daunorubicine liposomale	116	25	115 jours	Neutropénie, anémie
Docétaxel	25	80	Non rapportée	Toxicité neurologique, cardiaque, hématologique, digestive, hépatique
Doxorubicine	50	10	Non rapportée	Neutropénie, anémie
Doxorubicine	29	48	Non rapportée	
Doxorubicine liposomale	133	36	90 jours	
Paclitaxel	20	65	10 semaines	Toxicité neurologique, cardiaque, hématologique, digestive, hépatique
Vinblastine	38	26	13 semaines	Toxicité neurologique, bronchospasme, digestives, alopécie, leucopénie
Vinblastine	18	61	17 semaines	
Vinblastine	5	80	10 semaines	
Vincristine	23	61	4 mois	Toxicité neurologique et myélosuppression

(D'après Martinez et al. VIH édition 2011, Doin Editeur)

Les polychimiothérapies présentent une efficacité supérieure aux monochimiothérapies, mais des effets indésirables plus importants. L'association de référence repose sur l'association d'adriamycine (doxorubicine), bléomycine et vincristine (ABV) et permet un taux de réponse partielle ou complète compris entre 25 et 88%, cependant cette association a été évaluée avant l'ère des trithérapies (Tableau 8). Les effets indésirables de type cardiotoxicité, myélosuppression, nausées/vomissements, alopécie et mucites limitent fréquemment leur utilisation (2, 71), tout comme les interactions médicamenteuses avec les ARV.

Tableau 8 : Efficacité des principales polychimiothérapies utilisées dans la prise en charge de la MK

Traitement	Nombre de patients	Réponse globale (% de réponses partielle et complète)	Durée médiane de réponse
ABV/ADV	18	78	5 mois
ABVb	31	84	8 mois
ABV	33	79	9 mois
	30	88	9 mois
VV	81	43	9 mois
BV	18	72	Non rapportée

(D'après Martinez et al. VIH édition 2011, Doin Editeur) ABV : doxorubicine, bléomycine, vinblastine, ADV : actinomycine D, dacarbazine, vincristine, ABVb : doxorubicine, bléomycine, vincristine, VV : vincristine, vinblastine, BV : bléomycine, vincristine

Interactions médicamenteuses entre traitements généraux et ARV

Comme décrit plus tôt, il existe des interactions médicamenteuses entre les ARV et certaines chimiothérapies cytotoxiques, notamment certains traitements généraux prescrits dans la MK. Malheureusement peu d'études prospectives s'intéressent spécifiquement à ces effets, pourtant à risque d'effets indésirables graves pour les patients ou encore de résistance aux traitements.

Des interactions pharmacocinétiques sont notamment à craindre avec les vinca-alcaloïdes, tels que la vinblastine, qui sont des substrats du CYP 3A4 (414). Différentes études ont rapporté des cas de neutropénies sévères voire d'engagement du pronostic vital chez des patients recevant une association vinblastine-IP potentialisé par le ritonavir (IP/r). Ces symptômes sont liés aux effets inhibiteurs enzymatiques des IP/r (415-417). Le ritonavir, un inhibiteur des Pgp, peut entrainer *in vitro* l'accumulation intracellulaire de vinblastine (418). Enfin, la vinblastine possède un métabolite actif, l'inhibition du CYP 3A4 pourrait donc également diminuer la formation de ce dérivé et donc l'efficacité du traitement (419). Chez les patients recevant un inhibiteur du CYP 3A4, une réduction des doses de vinblastine à 4 voire 2 mg/m²/semaine et/ou l'association avec un facteur de croissance hématopoïétique semblent à privilégier en cas de survenue d'effets indésirables (415). Cependant, aucune étude robuste n'a investigué de façon optimale les interactions entre ARV et vinca-alcaloïdes. Cette dernière pourrait permettre l'émission de recommandations d'adaptation posologique plus fines.

Le potentiel d'interaction entre la bléomycine ou les anthracyclines et les ARV en revanche semble limité, les voies métaboliques de ces composés ne passant pas par le système des CYP (420). La bléomycine, par inhibition des fonctions oxydatives hépatiques pourrait cependant augmenter les concentrations plasmatiques des IP et INNTI, mais les conséquences cliniques semblent faibles et nécessitent principalement un suivi clinique et pharmacologique des concentrations plasmatiques des ARV chez les patients (421). Un risque théorique d'interaction via les pompes d'efflux existe également avec la daunorubicine et la doxorubicine, qui sont des substrats des Pgp (422). Il a été montré *in vitro* que le ritonavir, inhibiteur des Pgp, pouvait augmenter la toxicité de la doxorubicine sur des cellules CEM/VM-1-5 (423). L'impact clinique de ces interactions reste cependant peu connu dans la MK et ces associations sont en pratique fréquemment employées, utiles et bénéfiques pour les patients dans la prise en charge des formes agressives de MK-VIH (368).

L'anticipation et l'interprétation des effets liés à des interactions entre des associations de chimiothérapies cytotoxiques et des ARV sont quant à elles complexes, de par la possibilité de réactions croisées entre les molécules. On ne dispose pas de données dans la MK-VIH, mais des études menées chez des patients VIH, atteints de lymphomes de Hodgkin ou non Hodgkiniens et recevant des polychimiothérapies ont mis en évidence ces interactions. Dans l'une d'elles, les patients étaient traités par les associations ABVD (doxorubicine, bléomycine, vinblastine, dacarbazine) ou MOPP/ABV (chlormethine, vincristine, procarbazine, prednisone / doxorubicine, bleomycine, vinblastine) en association avec des ARV. L'utilisation de ritonavir chez ces derniers était associée à un risque majoré de neuropathies ou de toxicité hématologique de grade 3-4 (424). Dans une seconde étude, les patients traités par CHOP (doxorubicine, cyclophosphamide, vincristine et prednisolone) associé à IP/r présentaient un risque de déséquilibre du traitement ARV (425).

A l'heure actuelle, en l'absence de données exhaustives sur les interactions médicamenteuses entre ARV et chimiothérapies cytotoxiques, le recours à des ARV présentant un potentiel d'interactions moindre, tels que les associations d'INTI et d'inhibiteur de l'intégrase (INI : raltégravir, dolutégravir) (426, 427), de rilpivirine en cas de traitement nécessaire par INNTI (428, 429), de maraviroc (430, 431), voire d'enfuvirtide (432) devrait être privilégié chez les patients traités par mono ou polychimiothérapie. Par ailleurs, une surveillance clinique rapprochée et un suivi des concentrations plasmatiques des ARV pendant toute la durée de l'association et quelques semaines après l'arrêt, devraient être effectués systématiquement, afin de limiter les risques d'échappements thérapeutiques ou de toxicités.

Globalement dans la prise en charge de la MK-VIH, l'absence de traitement efficace par voie orale, les rechutes fréquentes et rapides à l'arrêt des chimiothérapies cytotoxiques et la présence d'interactions médicamenteuses difficilement prévisibles rendent nécessaire l'étude d'alternatives thérapeutiques, afin d'améliorer la prise en charge des patients et leur qualité de vie. Depuis peu, une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques de cette maladie a permis de proposer de nouvelles approches thérapeutiques, actuellement en cours d'évaluation.

2) Nouvelles stratégies thérapeutiques

Une meilleure compréhension des mécanismes oncogéniques d'HHV-8 et de la physiopathologie de la MK a mené au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques

plus spécifiques la MK. Elles ont notamment pour cibles le virus HHV-8, l'angiogenèse ou utilisent les propriétés immunomodulatrices de différentes molécules.

a. Traitements ciblant le virus HHV-8

Connaissant le rôle prépondérant d'HHV-8 dans la physiopathologie de la MK, il est tentant d'utiliser des antiviraux ciblant ce microorganisme.

Des données *in vitro* ont montré qu'HHV-8 était résistant à l'aciclovir, mais sensible au ganciclovir, cidofovir et foscarnet (433). Un essai contrôlé, en double aveugle, a montré une diminution de la réplication d'HHV-8 chez des patients infectés, traités par valganciclovir (434). Deux études ont également rapporté une diminution du risque de développer une MK chez des patients infectés par le VIH recevant du foscarnet ou du ganciclovir dans le cadre d'infections à CMV (435, 436). En revanche, aucune étude n'a prouvé l'efficacité de ces molécules dans la prise en charge de la MK. Le cidofovir s'est même montré inefficace chez 7 patients atteints de MK-VIH ou classique (437).

Les médicaments antiviraux n'agissent que sur la forme lytique du virus, or dans la MK, le virus se trouve majoritairement sous forme latente (85, 438). Certaines molécules peuvent cependant induire le passage en phase lytique du virus, dans les cellules infectées, aboutissant à l'apoptose de ces dernières, c'est le cas de l'acide valproïque (439, 440). A l'heure actuelle, les études portent principalement sur des molécules au pouvoir d'induction de la phase lytique plus puissant, tels que le bortezomib, un inhibiteur du protéasome (441). En raison d'une métabolisation de cette molécule par les CYP3A4, 2C19 et 1A2, des interactions médicamenteuses seront attendues en cas d'association avec des IP/r ou des INNTI (442).

b. Traitements ciblant l'angiogenèse

L'implication prépondérante des cellules endothéliales et de l'angiogenèse dans la MK laisse préjuger d'une vulnérabilité particulière de cette pathologie aux molécules ciblant une, ou plusieurs étapes du processus angiogénique. Des molécules ciblant ces différentes étapes ont été ou sont donc testées actuellement dans cette indication. C'est le cas de molécules ciblant les MMP, le VEGF ou encore le bFGF.

Le COL-3 (metastat) et le rebimastat (BMS-275291) sont des inhibiteurs des MMP de première génération, administrés par voie orale. Ils ont présenté dans des essais cliniques de phase II et I-II, des résultats intéressants dans la MK, avec une bonne tolérance, mais un effet anti-tumoral faible (443-445). A l'heure actuelle, aucune étude de phase III n'est en cours. La métabolisation de COL-3 ne passant pas par les CYP et cette molécule n'étant pas substrat

des Pgp, des interactions avec les ARV ne sont pas attendues (446). En revanche, aucune donnée de pharmacocinétique n'est disponible pour le rebimastat. L'utilisation de molécules ciblant uniquement les MMP impliquées dans la progression de la MK pourraient avoir un effet anti-angiogénique et anti-tumoral plus ciblé (447, 448). C'est le cas du saquinavir et de l'indinavir, deux IP ciblant principalement MMP-2, mais de moins en moins utilisés dans la prise en charge du VIH (449-451).

Des molécules ciblant le VEGF sont également testées. C'est le cas du bevacizumab, un anticorps monoclonal anti-VEGF (NCT00923936), le PCT299, une petite molécule de synthèse régulant la synthèse de VEGF (NCT00686842) ou encore de VEGF-AS, un oligo-nucléotide anti-sens bloquant la région de l'ADN codant pour l'ensemble des isoformes du VEGF. Ces molécules ont montré pour la plupart une bonne tolérance et une efficacité sur un petit nombre de patients. Cependant les résultats contradictoires, nécessitent des investigations supplémentaires (452-454). Par ailleurs, deux cas de défaillances hépato-rénales et de thombocytopénies fatals ont été décrits chez des patients traités par semaxinib (SU5416), un inhibiteur du domaine tyrosine kinase du VEGFR-2, et ce malgré une bonne tolérance rapportée dans un essai de phase I dans la MK-VIH (453). Depuis aucune nouvelle étude n'a été menée.

Comme nous l'avons vu, la MK présente un mécanisme physiopathologique complexe et multifactoriel. L'emploi de combinaison de molécules ciblées ou de molécules immunomodulatrices multifonctionnelles pourrait donc constituer des alternatives thérapeutiques plus efficaces que les monothérapies ciblant une seule voie impliquée dans la MK.

c. Traitements immunomodulateurs

Différents traitements immunomodulateurs sont à l'étude dans la MK : les inhibiteurs du mTOR (mamalian target of Rapamycin), l'IL-12 ou encore les dérivés du thalidomide.

Les inhibiteurs du mTOR

Comme présenté précédemment, la voie PI3K/Akt/mTOR joue un rôle crucial dans la prolifération, la survie cellulaire et l'angiogenèse. Différentes protéines codées par HHV-8 sont capables d'activer cette voie complexe de signalisation (455).

L'utilisation du sirolimus ou de l'everolimus, inhibant spécifiquement le mTOR, est associée à une régression des lésions de MK. Cette amélioration pourrait s'expliquer d'une part, par l'effet sur le mTOR, lui-même activé par HHV-8 (456, 457), mais aussi par une

diminution de la production de VEGF et par l'induction d'une diminution de la sensibilité des cellules endothéliales à ce facteur de croissance (458).

Cette stratégie thérapeutique a été utilisée chez des patients ayant développé une MK-iatrogène, suite à la prise de traitement immunosuppresseur à base de ciclosporine. Dans une étude prospective, l'arrêt de cet immunosuppresseur au profit du sirolimus a permis une régression des lésions et une réponse complète chez l'ensemble des patients suivis (n=15) (459). En revanche, dans une étude de phase II menée chez 11 patients atteints de MK-classique traités par everolimus, une progression et régression simultanées, paradoxales, de la maladie ont été rapportées chez 8 d'entre eux (460). Enfin, une étude prospective évaluant l'effet du sirolimus chez 7 patients atteints de MK-VIH, traités par ARV, a montré une régression partielle de la maladie chez 3 d'entre eux, avec une tolérance globalement bonne (461). Le sirolimus étant métabolisé par le CYP 3A4 et étant substrat des Pgp, de nombreuses interactions médicamenteuses ont été rapportées avec les IP/r et les INNTI dans cette étude, nécessitant un suivi thérapeutique rapproché et de multiples adaptations thérapeutiques, allant jusqu'à des doses cumulatives hebdomadaires 200 fois plus élevées chez les patients recevant des INNTI (2,3 à 6,7 mg/j) par rapport à ceux sous IP/r (0,1 mg 2 fois/semaine à 0,3 mg 3 fois/semaine).

L'IL-12

L'Il-12 est une cytokine multifonctionnelle bloquant la croissance tumorale et l'angiogenèse et induisant une réponse immune de type Th1 (pro-inflammatoire et antivirale), via la production d'IFN-γ et de CXCL10. Elle a également été testée dans des essais cliniques de phase I et II dans la MK. Seule, elle induit une réponse anti-tumorale en plusieurs mois, limitant son utilisation dans les formes avancées (462). Elle a par la suite été utilisée en combinaison avec la doxorubicine pégylée, avec une réponse rapide et élevée chez plus de 80% des sujets (463).

Les inhibiteurs de tyrosine kinase

Différents inhibiteurs de tyrosine kinase, tels que l'imatinib, le sunitinib ou le sorafenib ont également été testés dans la MK. Ces petites molécules, disponibles par voie orale, ciblent différents récepteurs de tyrosines kinases, tels que le récepteur du PDGF, VEGFR-1 et -2 ou encore c-kit. Ces récepteurs sont impliqués dans la croissance de nombreuses tumeurs et notamment dans la MK (464).

Dans une première étude, l'imatinib (600 mg/jour) a donné un taux de réponse partielle de 50% chez 10 patients atteints de MK-VIH traités par ARV, avec une tolérance

médiocre, ayant nécessité des adaptations posologiques (465). Dans une étude de phase II plus récente, 33% des 30 patients traités par imatinib (400 mg/jour) ont montré une réponse partielle au traitement (466). L'analyse pharmacocinétique de cette étude confirmait l'existence d'interactions avec les ARV, attendues en raison du métabolisme de l'imatinib via les CYP et notamment le 3A4 (467), mais n'induisant pas de toxicité augmentée d'après les auteurs. Cependant, l'utilisation à plus grande échelle devrait se faire avec prudence, comme le recommande la mise en garde spéciale de l'*European Medicines Agency* dans ses mentions légales du produit (468).

Pour des raisons administratives, un essai de phase II évaluant le sunitinib dans la MK-endémique a été suspendu (NCT00521092). Là encore, des interactions avec les ARV étaient à prévoir en raison de l'implication du CYP 3A4 dans le métabolisme du sunitinib et la formation d'un métabolite actif. L'association avec des inducteurs puissants des CYP 3A4 devrait d'ailleurs être évitée (469).

Suite à la réponse clinique rapportée chez un patient atteint de MK traité par sorafenib, une étude interventionnelle a été clôturée dans cette indication en 2013 (NCT00287495) (470). Les résultats sont toujours en attente, des interactions principalement avec les inducteurs enzymatiques sont possibles, le sorafenib étant métabolisé par le CYP 3A4 et l'UGT1A (471). Par ailleurs ce composé inhibe lui-même les CYP 2B6, 2C8, 2C9, l'UGT1A et la Pgp avec une déstabilisation possible de certains traitements ARV, là encore non étudiée à ce jour (472).

d. Traitements par un dérivé du thalidomide : le lénalidomide

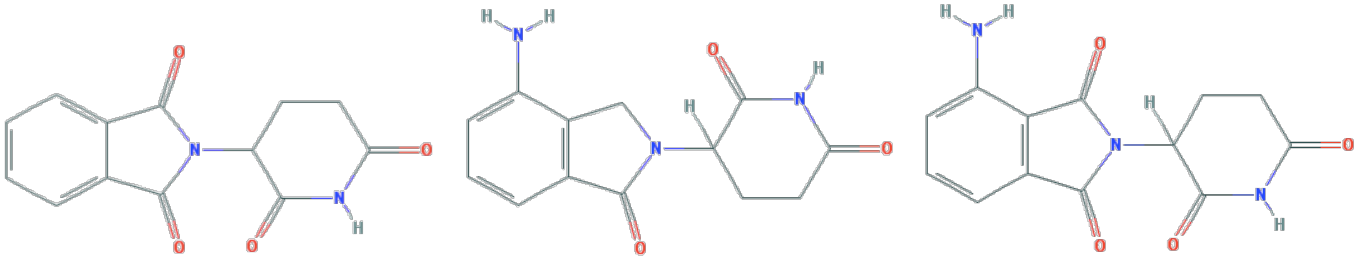
Les dérivés du thalidomide, qui sont des molécules immunomodulatrices aux effets pléïotropes, sont également proposés dans le traitement de la MK et ont montré des résultats intéressants dans cette indication.

Généralités

Le thalidomide et ses dérivés sont de petites molécules, disponibles par voie orale, présentant des effets multiples, appelées IMID®. Elles sont utilisées dans différentes maladies inflammatoires et néoplasiques. A l'heure actuelle, 3 représentants de cette famille sont disponibles : le thalidomide et ses dérivés de seconde génération, le lénalidomide et le pomalidomide. Ils sont indiqués dans la prise en charge des myélomes multiples ou syndrômes myélodysplasiques en première, deuxième et troisième intention respectivement.

Le thalidomide peut également être utilisé dans certaines maladies auto-immunes, telles que le lupus érythémateux cutané, la maladie de Crohn ou la maladie de Behçet (473-475).

Le thalidomide est un dérivé synthétique de l'acide glutamique. Il se présente sous forme d'énantiomères S- et R- qui possèdent chacun des propriétés biologiques différentes. La seconde génération de molécules a été développée afin de moduler les propriétés immunologiques et antinéoplasiques du thalidomide et de diminuer sa toxicité (Figure 23) (3).



Thalidomide ($C_{13}H_{10}N_2O_4$) **Lenalidomide** ($C_{13}H_{13}N_3O_3$) **Pomalidomide** ($C_{13}H_{11}N_3O_4$)

Figure 23 : Structures chimiques des IMIDs

La structure du thalidomide a été modifiée par l'ajout d'une amine (-NH_2) en position 4 du groupement phthalyl. Pour le lénalidomide l'un des carbonyles (C = O) du groupement phtalyl a été supprimé. Ces modifications de structure ont pour but d'augmenter les propriétés immunologiques et antinéoplasiques et de diminuer la toxicité des composés

Le lénalidomide et le pomalidomide présentent des propriétés anti-tumorales supérieures à celles du thalidomide. Dans une étude menée *in vitro* sur une lignée cellulaire issue de myélome multiple, 50% de la synthèse d'ADN était inhibée par des concentrations en lénalidomide et pomalidomide comprises entre 0,1 et 1 µM (micromole/ litre) pour le premier et 0,01 et 0,1 µM pour le deuxième composé, alors que seule 15% d'inhibition était observée avec 100 µM de thalidomide (476).

Leurs effets indésirables sont également modulés : les composés de seconde génération induisant moins de sédation, constipation et neuropathie (477). Le lénalidomide possède cependant un risque accru de cancers-secondaires, notamment de leucémie aiguë myéloïde, de syndrome myélodysplasique, d'épithélioma basocellulaire ou spinocellulaire et une hématotoxicité supérieure à celle du thalidomide (478), cette dernière pouvant être prise en charge par l'utilisation de facteurs de croissance hématopoïétiques (479, 480). L'ensemble des IMID® présente des risques thrombotiques, nécessitant l'administration concomitante d'un traitement prophylactique.

Mécanisme d'action

Les IMID® présentent un mécanisme d'action complexe et pléïotrope. Ils possèdent à la fois des effets immunomodulateurs, des propriétés anti-tumorales et anti-angiogéniques

ainsi que des effets antiviraux. Les effets spécifiques du lénalidomide sont décrits ci-après (Figure 24).

Effets immunomodulateurs

Le lénalidomide est notamment capable de moduler les réponses T, B et NK (Natural Killer). Il promeut la réponse humorale et la réponse anti-vaccinale. Ses propriétés immunomodulatrices complexes ne sont qu'en partie déterminées, mais il a été démontré sur des tests *in vitro* et *in vivo* que cette molécule est capable :

- d'inhiber la sécrétion de certaines cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF-α, l'IL-1, l'IL-6, l'IL-12 et d'augmenter la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires telle que l'Il-10 (476, 481-483). Sa capacité à diminuer la production de TNF-α est 50 000 fois supérieure à celle du thalidomide (484).

- d'induire l'activation directe des lymphocytes T et d'orienter vers une réponse de type Th1. Cette réponse s'accompagne notamment d'une production d'IL-2, d'IFN-γ, de GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor), et d'IL-8 (482, 485) aboutissant à une prolifération de lymphocytes T et une activation des cellules NK.

- d'augmenter l'activation des cellules NK, l'expansion de cellules NKT (Natural Killer Tueuses) et leur capacité à produire de l'IFN-γ (486). Ces cellules assurent une cytotoxicité rapide permettant une surveillance anti-virale et anti-tumorale.

- d'améliorer la production d'anticorps par les lymphocytes B et la réponse humorale en cas de vaccination (487). En effet, après une vaccination contre le pneumocoque chez des patients traités par lénalidomide, les réponses anticorps et cytotoxiques spécifiques du pneumocoque sont supérieures à celles observées chez des patients vaccinés avant mise sous lénalidomide (488).

Effets anti-angiogéniques

Le lénalidomide est également capable d'inhiber l'angiogenèse et la formation de microvaisseaux. Il inhibe notamment la production de VEGF et d'IL-6 dans le myélome multiple ainsi que la migration et l'adhésion des cellules endothéliales et la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (489, 490). Ses effets anti-angiogéniques sont 2 à 3 fois supérieurs à ceux du thalidomide (491).

Effets anti-tumoraux propres

Le lénalidomide présente également des effets anti-tumoraux. Il est capable de bloquer le cycle cellulaire en phase G0-G1 (492). Il peut induire *in vitro* un effet antiprolifératif sur

des lignées cellulaires de myélomes multiples en l'absence de cellules immunitaires effectrices, est capable d'inhiber la prolifération des certaines cellules malignes hématopoïétiques (plasmocytes malins de myélome multiple, *etc*.) (485) et il peut induire la mort cellulaire par apoptose via l'activation des caspases (493).

Autres effets

Il est intéressant de noter que le lénalidomide possède également des propriétés antivirales. Il est notamment capable d'induire une réponse lymphocytes T CD8 antivirale vis-à-vis du CMV et du VIH (494).

Enfin, il semble moduler l'expression du trio CXCL12/CXCR4-CXCR7. *In vitro,* Wobus et coll. ont montré que le lénalidomide pouvait inhiber la sécrétion de CXCL12 par les cellules stromales mésenchymateuses et diminuer la migration des cellules souches hématopoïétiques (495). Il a également été rapporté une augmentation de l'expression de CXCR4 à la surface des cellules exprimant le CD34, suite à un traitement par lénalidomide (496, 497).

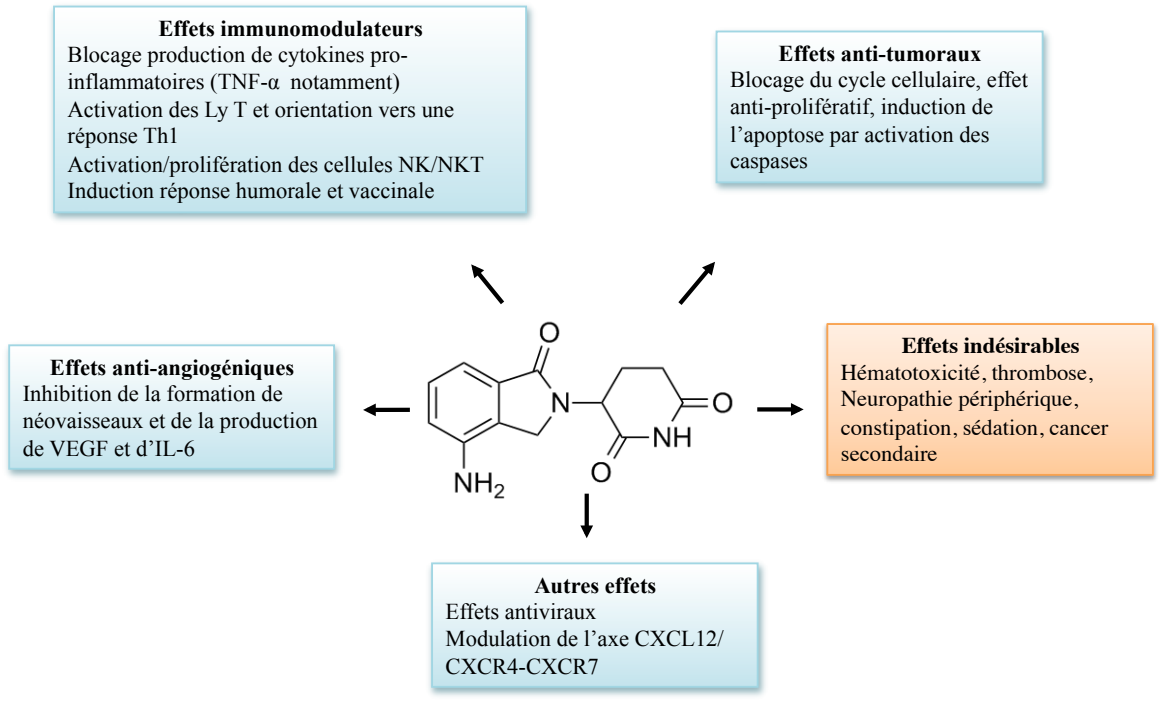


Figure 24 : Effets pléïotropes du lénalidomide
(Modifiée d'après Shortt et coll., Oncogene 2013) Les IMID® présentent des effets immunomodulateurs, anti-tumoraux, anti-angiogéniques et épigénétiques. Ils présentent également des effets indésirables. TNF- α : Tumor Necrosis Factor alpha, Ly T : lymphocyte T, NK : Natural Killer, NKT : Natural Killer Tueuses, Th1 : lymphocyte T helper de type 1, VEGF : Vacsular Endothelial Growth Factor, IL-6 : Interleukine 6

Données dans la maladie de Kaposi

Les IMID® modulent donc l'expression de molécules clés, impliquées dans la physiopathologie de la MK. Ces constatations cumulées à quelques données publiées dans la littérature ont laissé présumer d'une efficacité du lénalidomide dans cette indication. En effet, deux publications ont rapporté les guérisons respectives de 1 et 3 patients atteints de MK-VIH, suite à la mise sous lénalidomide (498, 499).

Des données publiées avec le thalidomide dans cette indication sont également en faveur d'une efficacité clinique et virologique des IMID®. Deux premières études, menées chez des patients atteints de MK-VIH, naïfs ou non d'ARV, rapportaient des taux de réponse de 34 et 47% avec un taux d'arrêt de traitement pour effets indésirables de 35% (500, 501). Des résultats similaires avaient été observés dans des cas rapportés ou dans le cadre d'essais cliniques menés chez des patients atteints de MK-VIH, -classique ou -iatrogène (502-505). Globalement, le thalidomide semble efficace dans cette indication, mais les nombreux effets indésirables rapportés limitent son utilisation, justifiant la mise en place d'essai clinique visant à évaluer l'efficacité de ses dérivés dans la MK (506).

Depuis 2010, deux essais cliniques de phase II se sont intéressés au traitement par lénalidomide dans la MK-VIH. L'un d'entre eux est soutenu par le *National Cancer Institute* (NCI) et l'autre par l'Agence Nationale de Recherche sur le SIDA et les hépatites (ANRS). Ce projet de thèse s'intègre dans le cadre de l'essai clinique ARNS 154 Lenakap.

Le pomalidomide, dernière molécule développée, a obtenu son autorisation de mise sur le marché en Europe en août 2013, en troisième intention dans le myélome multiple (475). Les premières données dans la MK ont été présentés à la 22ème *Conference on Retrovirus and Opportunistic Infections* en 2015 et portent sur les résultats d'un essai clinique de phase I/II, démarré en 2011 aux Etats-Unis (507). Ces derniers rapportent une réponse complète ou partielle chez 68% des patients, associée à une bonne tolérance des patients.

Interactions médicamenteuses avec les ARV

A notre connaissance, aucune étude d'interaction entre les IMID® et les ARV n'a été menée. Le thalidomide est quasiment exclusivement métabolisé par hydrolyse spontanée, non enzymatique et n'est ni substrat, ni inducteur, ni inhibiteur des CYP et Pgp (508). Il est donc peu probable que des interactions pharmacocinétiques surviennent avec les ARV.

Le lénalidomide, pour sa part, est un substrat faible des Pgp, protéines induites ou inhibées par certains ARV (509). A l'heure actuelle, les données sur la pertinence clinique d'interactions entre le lénalidomide et des inducteurs ou inhibiteurs des Pgp sont

contradictoires. En effet, Hofmeister et coll. ont rapporté en 2011 l'existence d'une interaction cliniquement significative entre le lénalidomide et le temsirolimus, un inhibiteur/substrat modéré des Pgp (509). Cette hypothèse a par la suite été contestée à 2 reprises par l'équipe de Chen et coll. Dans une étude en cross-over menée par cette équipe associant lénalidomide 25 mg 1 prise, puis quinidine (inhibiteur des Pgp) 300-600 mg 2 fois par jour pendant 5 jours plus lénalidomide à J4 +/- temsirolimus (une dose unique de 25 mg) aucune modification statistiquement significative de la concentration maximale ou de l'aire sous la courbe des concentrations de lénalidomide n'a été retrouvée (510, 511). En revanche, en 2012, Takahashi et coll. ont rapporté le cas d'une patiente présentant une neutropénie et des infections répétées, suite à l'association quotidienne de 15 mg de lénalidomide à 100 mg d'itraconazole, un antifongique azolé inhibiteur du CYP 3A4 et des Pgp (512). Cette dernière présentait des concentrations plasmatiques de lénalidomide largement supérieures à celles retrouvées après arrêt de l'itraconazole et reprise du lénalidomide au tiers de la dose initiale. Les données relatives aux interactions médicamenteuses du lénalidomide sont encore incertaines, des interactions avec les IP/r et INNTI sont possibles et restent à explorer, tout comme leur pertinence clinique.

Le pomalidomide, présente des propriétés anti-tumorales, immunomodulatrices et anti-angiogéniques plus puissantes que ces 2 prédécesseurs (493). C'est aussi l'IMID® qui possède les propriétés pharmacocinétiques les plus à risque d'interactions. En effet, le pomalidomide est métabolisé par le CYP 1A2 et 3A4 et est un substrat des Pgp (513). Une étude menée chez des sujets sains semble indiquer que les interactions avec les inhibiteurs ou inducteurs des CYP 3A4 et des Pgp (ketoconazole ou carbamazepine), ne devraient pas avoir de conséquences cliniques pour les patients, tandis qu'une réduction des doses de 50% devrait être proposée en cas d'association à un inhibiteur puissant du CYP 1A2 (fluvoxamine) (514). Globalement, bien que les conséquences cliniques ne soient pas connues, le risque d'interactions avec les ARV est plus important pour cette molécule.

Enfin, l'élimination de ces trois composés se faisant par voie rénale, une adaptation des posologies en cas d'insuffisance rénale est nécessaire et des précautions en cas d'association avec des molécules potentiellement néphrotoxiques, telle que le ténofovir devraient être prise en compte. L'étude des modifications des paramètres pharmacologiques du lénalidomide et des traitements associés constitue donc un axe de recherche.

Objectifs des travaux

« Un problème sans solution est un problème mal posé »

Albert Einstein

La prise en charge thérapeutique et le devenir des patients développant une MK ont profondément évolué depuis l'apparition des associations antirétrovirales. Cependant, aucun traitement curatif n'a encore été identifié et bien que moins fréquente, la MK reste l'une des pathologies tumorales les plus fréquentes au cours de l'infection par le VIH. En outre, certains patients développent une MK-VIH, malgré une trithérapie efficace et un taux de lymphocytes T CD4 satisfaisant, cette dernière ne répondant pas toujours aux traitements conventionnels par chimiothérapie. Il existe ainsi une justification éthique et de Santé Publique à l'étude de l'efficacité de toute nouvelle molécule dans ce type d'indication.

La première partie de ce travail, décrite en détail dans **l'article 1**, a pour objectif principal **d'évaluer l'efficacité du lénalidomide dans le traitement de la MK chez les patients VIH**. Les objectifs secondaires du travail visent à **estimer la tolérance des patients** au lénalidomide, **d'évaluer leur survie sans progression**, de **décrire l'évolution des marqueurs biologiques, immunologiques et virologiques,** plus ou moins associée à la réponse au traitement et enfin, **d'étudier les interactions médicamenteuses potentielles entre les ARV et le lénalidomide**. Cette molécule immunomodulatrice pleïotrope présente des propriétés anti-tumorales, anti-angiogéniques, anti-TNF-α et antivirales, composantes majeures de la physiopathologie de la MK (2, 3). Les premières données observées sur un petit nombre de patients atteints de MK-VIH suggèrent un impact positif d'un traitement par lénalidomide dans cette indication (498, 499).

L'essai clinique ANRS 154 Lenakap est une étude multicentrique, de phase II, en 2 étapes (plan de Gehan) ayant inclus 12 patients atteints d'une MK-VIH évolutive, malgré un traitement ARV efficace et échec d'au moins une ligne de chimiothérapie conventionnelle. Dans ce contexte, mon premier objectif a été d'étudier les variations des paramètres immuno-biologiques des patients, afin de déterminer des profils prédicteurs d'une réponse ou non au traitement. Mon second objectif a été d'étudier l'existence ou non d'interactions médicamenteuses entre les ARV et le lénalidomide. Enfin, j'ai participé à l'évaluation de la réponse au traitement, de la survie sans progression et de la tolérance au traitement des patients.

La deuxième partie de mon travail illustre les activités translationnelles de notre équipe de recherche, qui sont principalement axées sur l'étude moléculaire et fonctionnelle de la relation établie entre la chimiokine SDF-1/CXCL12 et ses récepteurs, CXCR4 et CXCR7, en immunopathologie. La MK est une pathologie multifactorielle, pour laquelle l'ensemble

des mécanismes physiopathologiques n'a pas été élucidé. A l'heure actuelle, notamment, nous ne disposons pas de biomarqueur permettant un suivi et une prise en charge optimale des patients atteints de MK. Des données de la littérature, principalement obtenues *in vitro,* suggèrent l'implication du trio CXCL12/CXCR4-CXCR7 dans la MK. Cependant, il n'existe que peu de publications sur le sujet, ces dernières n'incluent que quelques patients dont les données immunovirologiques sont souvent manquantes, leurs résultats sont parfois contradictoires et aucune n'analyse simultanément *in vivo,* l'implication des 3 progéniteurs (103, 104, 182, 254, 255, 284, 285, 304, 310).

Dans le cadre de l'essai clinique ARNS 154 Lenakap, une collection de biopsies cutanées à l'inclusion et une plasmathèque mensuelle ont été constituées pour chaque patient inclus. Des collaborations établies avec le Pr N. Dupin (service de Dermatologie de l'Hôpital Cochin, Paris), les Dr A. Carlotti (laboratoire d'Anatomopathologie de l'Hôpital Cochin) et C. Deback (laboratoire de Virologie, Hôpital P Brousse, Villejuif), nous ont permis d'obtenir les prélèvements de patients témoins (angiomes, MK-classique, volontaires sains, patients infectés par le VIH). Ce second travail, décrit en détail dans **l'article 2,** a pour but **d'évaluer le rôle de biomarqueurs potentiels de la MK des protéines du trio CXCL12/CXCR4-CXCR7.** Pour ce faire, mon premier objectif a été d'étudier le profil de distribution protéique et de quantifier le pourcentage de cellules positives pour CXCL12, CXCR4 et CXCR7 au sein des lésions cutanées de MK des patients et témoins ; puis d'analyser les corrélations avec différents marqueurs de la physiopathologie de la maladie (LANA, VEGF, taux de prolifération). Dans un deuxième temps, j'ai analysé l'expression de cytokines, chimiokines et facteurs de croissance, dont CXCL12, dans le plasma des patients et témoins, afin d'identifier un profil cytokinique associé à la pathologie et de vérifier le rôle potentiel de biomarqueur plasmatique de CXCL12. L'identification de nouveaux biomarqueurs de la pathologie permettra un meilleur suivi et une prise en charge thérapeutique optimisée des patients, tout en permettant une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques de la MK.

Matériels et Méthodes

« Dans la nature, tout a toujours une raison. Si tu comprends cette raison, tu n'as plus besoin de l'expérience »

Léonard De Vinci

1) Patients

Les analyses menées dans le cadre de cette thèse ont été effectuées sur les prélèvements de patients inclus dans l'essai clinique ANRS 154 Lenakap (NCT01282047).

Un total de douze patients a été inclus dans l'essai clinique entre novembre 2011 et février 2013. Selon le calendrier de l'essai (Tableau 9), deux BC (2 punchs de 4mm) ont été réalisées pour chaque patient à la visite de pré-inclusion dans les centres investigateurs. Une des biopsies a été utilisée pour la confirmation du diagnostic de MK. L'autre a été envoyée au laboratoire INSERM UMR_S996 pour l'étude de l'expression cytokinique cutanée. Une plasmathèque mensuelle a également été constituée dans les laboratoires de virologie de chaque centre investigateur, puis a fait l'objet d'une centralisation au laboratoire de Pharmacologie de l'Hôpital Bichat pour l'analyse des profils cytokiniques des patients et des interactions médicamenteuses entre les traitements ARV et le lénalidomide. Les données cliniques, biologiques et de tolérance ont été recueillies dans un eCRF géré par le centre de méthodologie et de gestion de D. Costagliola, INSERM UMR_S943.

Dans le cadre de l'étude des tissus cutanés, nous avons établi une collaboration avec le Pr N. Dupin, service de Dermatologie de l'Hôpital Tarnier et le Dr A. Carlotti, laboratoire d'anatomie et cytologie pathologiques du groupe hospitalier Cochin, afin d'obtenir des BC de groupes contrôles. Nous avons utilisé comme contrôle positif des biopsies de patients ayant développé une MK-classique, présentant donc un profil sérologique HHV-8 positif et VIH négatif. Nous avons par ailleurs choisi comme contrôle négatif des biopsies d'angiome. L'angiome cutané est une maladie inflammatoire bénigne, liée à des malformations vasculaires, se manifestant par une prolifération de vaisseaux lobulés au niveau du derme (Figure 25). Cette pathologie n'étant pas viro-induite, les patients étudiés étaient VIH et HHV-8 négatifs.

Dans le cadre de l'étude des plasmas, les résultats ont été comparés à ceux de patients témoins. Ont été recrutés des patients infectés par le VIH, contrôlés sur le plan immunovirologique, plus ou moins infectés par HHV-8, mais exempts de MK (VIH sans MK), appariés au patients de l'essai sur l'âge, le sexe, la charge virale, le taux de CD4 et les ARV, ainsi que des donneurs de sang, appariés sur le sexe et l'âge des patients. Les prélèvements ont été obtenus grâce à une collaboration avec le Dr C. Deback, laboratoire de

virologie de l'Hôpital P. Brousse et via l'établissement français du sang. Les données démographiques des patients sont résumées dans le Tableau 10.

Nous avons obtenu l'accord du Comité Consultatif des Personnes se Prêtant à la recherche biomédicale de Bicêtre pour effectuer l'ensemble des recherches décrites ci-après, sur ces prélèvements.

Tableau 9 : Calendrier de l'essai clinique ANRS 154 Lenakap

	Pré-inclusion S-4	Inclusion S0	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S12	S16	S20	S24	S28	S32	S36	S40	S44	S48
Consentement éclairé	X																			
Histoire médicale	X																			
Dispensation du traitement		X				X				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Biopsie	X																			
Examen neurologique	X	X				X				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Evaluation de la polynévrite	X	X				X				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Examen clinique	X	X	X			X				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Description de l'atteinte cutanée	X	X	X			X				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Présence de signes d'atteinte viscérale	X	X	X			X				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Bilan biologique :																				
Bilan de thrombose[1] (2 tubes citratés 4,5 ml + 1 tube sec à gel 4ml)	X																			
NFS, plaquettes[2] (1 tube EDTA 5ml)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Ionogramme sanguin, créatinine (1 tube héparinate de lithium 5 ml)	X	X				X				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Transaminases (1 tube sec 5ml)	X	X				X				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Dosage des ßHCG (1 tube sec 5 ml)	X	X				X				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
TSH us (1 tube sec 5 ml)	X	X				X				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
CD4, CD8 (1 tube EDTA 5 ml)	X	X				X				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
ARN VIH-1 (1 tube EDTA 10 ml)	X	X				X				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
PCR HHV-8 (1 tube EDTA 5 ml)		X				X					X			X						
Evaluation du score PGA		X				X				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Photographies numériques		X				X				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Imageries si atteinte viscérale		X									X			X			X			X
Plasmathèque (1 tube EDTA 10 ml)		X				X				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

1 : Temps de céphaline activée, anti-ß2GP1, dosages protéine C et protéine S, antithrombine III

2 : 1 fois par semaine, pendant les 8 premières semaines de traitement, puis une fois par mois au minimum

(D'après le protocole de l'essai clinique ANRS 154 Lenakap).

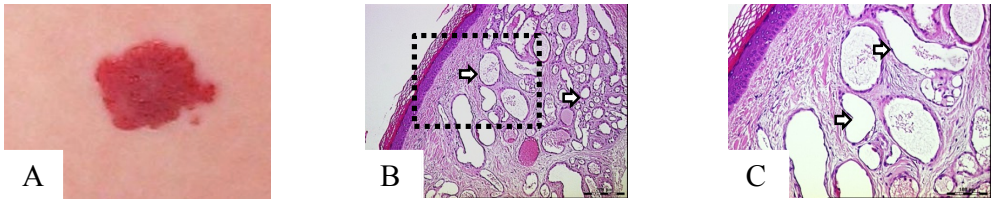


Figure 25 : Lésion d'angiome cutané

A : Aspect extérieur d'une lésion cutanée d'angiome capillaire, B-C : Lésion d'angiome cutané montrant une prolifération de vaisseaux à disposition lobulée dans le derme (flèches blanches)

Tableau 10 : Données démographiques des patients inclus dans ce travail

	MK-VIH	MK-classique	Angiomes	VIH non-KS	Donneurs de sang
Nombre de patients, n	12	12	10	12	13
Nombre d'échantillons, n					
Biopsies cutanées	16	21	20	0	0
Plasma	20	0	0	12	13
Types de lésions, n (%)					
Maculaire	7 (43.8)	4 (19)	-	-	-
Papulaire	7 (43.8)	6 (29)	-	-	-
Nodulaire	2 (12.5)	11 (52)	-	-	-
Age, année (IQR)	48 (40-52)	75 (69-80)	63 (46-68)	43 (40-52)	45 (33-52)
Valeur de *P*[1]		**<0.0001**	**0.037**	0.831	0.925
Sexe masculin, n (%)	12 (100)	12 (100)	9 (90)	12 (100)	13 (100)
Origine ethnique, n (%)					
Caucasien	9 (75)	11 (92)	6 (60)	9 (82)	13 (100)
Africain	3 (25)	1 (8)	4 (40)	2 (18)	0 (0)
Durée d'évolution de la MK, moyenne (IQR)	5 (0.8-20.0)	6 (3.3-8.8)	-	-	-
Valeur de *P*[1]		0.623	-	-	-
Taux de CD4 /mm^3 moyenne (IQR)	444 (286–612)	697 (475-1158)	ND	595 (407-676)	ND
Valeur de *P*[1]		**0.036**	-	0.100	-
CV VIH <50cp/ml, n (%)	12 (100)	-	-	12 (100)	-
Combinaison ARV					
2 INTI + 1 IP/r	7	-	-	8	-
2 INTI+ 1 INNTI	2	-	-	2	-
Autre[2]	3	-	-	2	-
Lignes de chimiothérapies antérieures, moyenne (IQR)	4.5 (1.3–6)	1 (0-2.5)	-	-	-
Valeur de *P*		**0.0005**	-	-	-

Abréviations: MK-VIH : patients inclus dans l'essai ANRS 154 Lenakap, MK-classique : MK classique, VIH non-KS: patients infectés par le VIH n'ayant pas développé de MK, n: nombre, MK : maladie de Kaposi, IQR: interquartiles, CD4: lymphocytes T CD4, ARV: combinaisons antirétrovirales, INTI : inhibiteur nucléos(t)idique de la reverse transcriptase, INNTI: inhibiteur non nucléosidique de la reverse transcriptase, IP/r: inhibiteur de la protéase potentialisé par ritonavir, -: non adapté, ND: non déterminé.

[1] Déterminé par le test de Mann-Whitney (chaque sous-groupe est comparé au groupe MK-VIH). Gras : $P<0.05$

[2] Autre : 2 INTI + 1 INI, 2 INTI + 1 IP/r + 1 INI ou 1 INNTI + 1 IP/r + 1 INI

2) Essai clinique

A. Plan de l'étude

L'essai clinique ANRS 154 Lenakap est un essai multicentrique, non comparatif, sans insu sur le traitement, de phase II, en 2 étapes (plan de Gehan), conçu pour évaluer l'efficacité et la sécurité du lénalidomide après 24 semaines de traitement, chez des patients atteints d'une MK-VIH évolutive, malgré un traitement ARV efficace et une ou plusieurs lignes antérieures de chimiothérapie. La durée de participation des patients dans l'essai est de 48 semaines. L'essai est conforme aux bonnes pratiques cliniques et à la Déclaration d'Helsinki. Le Comité Consultatif des Personnes se Prêtant à la recherche biomédicale d'Ile de France 7 a approuvé l'étude le 10/10/2012 et l'ANSM le 26/09/2012. Tous les patients ont donné leur consentement éclairé avant de participer à l'étude. Cette dernière est inscrite sur ClinicalTrials.gov (NCT01282047, ANRS 154 Lenakap). L'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale - l'Agence nationale de recherches sur le sida et les hépatites virales (INSERM-ANRS) est le promoteur de l'essai. Le conseil scientifique de l'essai est composé des personnes suivantes : L. Assoumou, F. Boué, F. Cardon, D. Costagliola, S. Couffin-Cadiergues, A. Curjol, C. Lebbé, A.G. Marcelin, V. Martinez-Pourcher (investigateur principal), B. Nkoumazok-Ename, I. Poizot-Martin, S. Pakianather. L'essai a été réalisé avec le soutien du laboratoire Celgene.

B. Critères d'inclusion et d'exclusion

Les critères d'inclusion de l'essai sont les suivants :

- Age compris entre 18 et 75 ans,
- Consentement libre, éclairé écrit,
- Sérologie VIH positive confirmée, avec une charge virale VIH indétectable,
- MK confirmée histologiquement présentant au moins 4 localisations cutanées,
- Traitement par combinaison ARV depuis au moins 12 mois, non interrompu et efficace depuis au moins 6 mois (CV VIH contrôlée < 50 copies/mL),
- Echec ou rechute après un traitement par une ou plusieurs lignes de chimiothérapie,
- MK en progression : la progression est définie comme l'indication à un traitement spécifique en dehors des ARV,
- Wash-out d'au-moins 4 semaines depuis la précédente chimiothérapie (8 semaines en cas de traitement par IFN-α),
- Index de Karnofsky > 70 %,

- Affiliation à un régime de sécurité de sociale ou ayant-droit,
- Ne pas faire de don de sang,
- Ne pas partager le traitement avec une autre personne,
- Pour les femmes en âge de procréer, utilisation sans interruption d'une méthode de contraception efficace, débutée au moins 4 semaines avant le début du traitement, pendant toute la durée du traitement et ce jusqu'à 4 semaines après la fin du traitement par lénalidomide,
- Pour les hommes, utilisation de préservatifs et absence de don de sperme pendant le traitement et ce jusqu'à une semaine après l'arrêt.

Les critères d'exclusion étaient les suivants :

- Grossesse (βHCG positive) ou allaitement en cours,
- MK avec localisation viscérale exclusivement,
- MK avec atteinte cardiaque et/ou broncho-pulmonaire,
- Deux CV VIH > 50 copies/ml sous ARV au cours des 6 derniers mois,
- Infection opportuniste ou non, non contrôlée,
- Affection cardiaque,
- Maladie de Castleman ou lymphome,
- Autres cancers ou hémopathies malignes concomitantes ou en antécédents,
- Polynévrite de grade > 2 selon la classification OMS,
- Associations avec des traitements neurotoxiques comme isoniazide et stavudine,
- Nombre de polynucléaires neutrophiles <1 000/mm^3 ou de plaquettes < 75 000/mm^3
- Espérance de vie < à 2 mois,
- Clairance de la créatinine ≤ 50 mL/min (formule de Cockcroft-Gault),
- Transaminases ASAT ou ALAT ≥ 3 x limite supérieure de la normale,
- Traitement concomitant avec d'autres agents anticancéreux,
- Allergie ou hypersensibilité connue au lénalidomide et/ou au thalidomide,
- Contre-indication au traitement par anticoagulants,
- Sauvegarde de justice, tutelle, curatelle.

C. **Traitement de l'étude**

La dose initiale recommandée de lénalidomide est de 25 mg, par voie orale, en une prise par jour, pendant les jours 1 à 21, suivie d'une période de 7 jours d'arrêt, tous les 28 jours, répétée pendant 24 semaines. A la semaine 24 (S24), le lénalidomide a été arrêté en cas

de progression de la maladie et les patients ont été suivis jusqu'à S48. En cas de rémission complète, le lénalidomide devait être poursuivi pendant 12 semaines supplémentaires et pendant 24 semaines en cas de rémission partielle ou de stabilité de la maladie. Les gélules de lénalidomide 5 et 25 mg ont été fournies par le laboratoire Celgene (France). En prévention des événements thromboemboliques, les patients ont reçu de l'aspirine faible dose, comme préconisé dans le résumé des caractéristiques du produit. Chez les patients présentant des antécédents d'embolie pulmonaire ou de thrombose veineuse profonde, une anticoagulation à doses thérapeutiques était préférée à l'aspirine. En cas d'éruption cutanée, de thrombocytopénie, d'insuffisance rénale ou de neutropénie, la dose de lénalidomide pouvait être adaptée à 5, 10 ou 15 mg par jour. En cas de neutropénie, l'utilisation d'un facteur de croissance hématopoïétique pouvait être envisagée.

D. **Suivi des patients**

Après confirmation du diagnostic (moins de 4 semaines avant l'inclusion), les évaluations prévues dans l'étude ont été effectuées à J0 (jour 0), les S1 et S4, puis tous les mois jusqu'à S48. A chaque visite, les patients ont eu une évaluation de la tolérance, des mesures des lymphocytes CD4, des CV HHV-8 et VIH et des prélèvements plasmatiques (Tableau 9). Quatre à 6 lésions index ont été choisies par l'investigateur de l'étude et le patient, afin d'être évaluées à chaque visite et rétrospectivement par le comité de validation des photographies, le type et la localisation des lésions index ont été enregistrées dans l'eCRF. Le *Physical Global Assessment* (PGA) a été utilisé à la fois par les investigateurs de l'étude et les patients afin d'évaluer les lésions index. Le degré d'infiltration et la taille des lésions ont été évalués par l'investigateur de l'étude. La réponse au traitement était définie de la façon suivante : rémission complète en cas de diminution de 100% du score PGA, rémission partielle : diminution du score PGA comprise entre 51 et 99%, légère amélioration : diminution comprise entre 26 et 50%, stabilité : augmentation ou diminution de moins de 25%, progression an cas d'augmentation de 25% ou plus (Tableau 11). L'évaluation finale portait sur la lésion index présentant la moins bonne réponse. Les critères ACTG (*AIDS Clinical Trials Group*) ont également été utilisés comme objectif secondaire de l'étude (Tableau 11). Des photographies numériques des lésions index ont été prises, pour permettre l'évaluation de la réponse par le comité de validation. La procédure de prise de photos a été normalisée, comme décrit en annexe du protocole de l'essai clinique. La détection d'HHV-8 a été basée sur la PCR en temps réel comme précédemment décrit (515). Les événements indésirables ont été enregistrés lors de chaque visite et classés selon l'échelle de l'ANRS

(Version n° 6 du 9 septembre 2003) (516). Les investigateurs ont évalué la relation de causalité avec le traitement à l'étude.

Tableau 11 : Concordances scores PGA et ACTG

Cotation PGA	Description	Réponse selon les critères ACTG
0 : "completely clear"	Pas de maladie évidente 100% d'amélioration	Clinique complète
1 : « almost clear »	Persistance de quelques lésions résiduelles avec amélioration ≥90 - <100%	Partielle
2 : « marked improvement »	Persistance de lésions mais amélioration significative ≥75 - <90%	Partielle
3 :« moderate improvement »	Intermédiaire entre le stade 2 et 4 ≥50 - <75%	Partielle
4 : « slight improvement »	Amélioration ≥25 - 50% mais évidence significative de persistance de la MK	Pas de correspondance
5 : « no change »	Pas de modification par rapport à l'inclusion +/- 25%	Stable
6 : « worse »	Progression par rapport à l'inclusion ≥25% ou plus	Progression

E. Evaluation

Le critère principal d'évaluation de l'essai clinique était la proportion de patients présentant une réponse partielle ou complète à S24, évaluée à la fois par l'investigateur et le patient, à l'aide du score PGA, pour les 4 à 6 lésions index. Un comité de validation indépendant était chargé d'évaluer le score pour chaque patient à partir des photographies disponibles. En cas de jugements discordants, l'évaluation du comité de validation a été retenue.

Les critères secondaires comprenaient la proportion de patients présentant une réponse partielle ou complète à S48 selon le score PGA, la variation de la somme des surfaces des lésions index entre l'inclusion, S24 et S48 (critères ACTG), les variations de CV VIH et HHV-8, des taux de CD4, CD8, le rapport CD4/CD8, le taux d'hémoglobine, de plaquettes, de leucocytes, de polynucléaires neutrophiles, la clairance de la créatinine, les taux de cytokines plasmatiques et les concentrations plasmatiques des ARV et de lénalidomide entre l'inclusion et la fin du traitement, la survie sans progression (un événement a été défini par la progression de la MK ou le décès), la tolérance clinique et biologique du lénalidomide et l'observance du traitement (nombre de gélules consommées divisé par le nombre de gélules récupérées).

3) Méthodes

L'ensemble des méthodes utilisées pour les différents travaux de recherche est détaillé ci-après.

A. Immunohistochimie et immunofluorescence

Les marquages immunohistochimiques (IHC) et les doubles marquages en immunofluorescence (IF) ont été réalisés au sein de la plateforme d'histologie immunopathologie PHIC, de Clamart. Les marquages ont été effectués sur des coupes de 5 µm de BC d'angiomes, de MK-classique et de MK-VIH, fixées dans du formol à 10% puis incluses en paraffine. Les simples marquages en IHC ont été effectués pour détecter les protéines CXCL12, CXCR4, CXCR7, LANA, VEGF et le marqueur Ki67 et des doubles marquages en IF pour détecter CXCL12, CXCR4, CXCR7 et LANA ou Ki67.

Les lames ont d'abord été déparaffinées par immersion dans du xylène, puis réhydratées par des bains successifs d'alcool à 100°C, 70°C et eau. Par la suite, les sites antigéniques ont été démasqués à l'aide d'un tampon citrate 1X pH 6,00 (Dako, Trappes, France) et d'un traitement par la chaleur (four à micro-ondes, 90°C, 15 minutes). Afin d'assurer une spécificité des marquages, un blocage de la biotine endogène a été effectué : les coupes ont été incubées pendant 10 minutes avec une solution Avidine 0,1%, ligand de la biotine endogène, puis 10 minutes avec une solution Biotine 0,01%, afin de saturer les sites de fixation de l'avidine (Dako Biotin Blocking System, Trappes, France). De l'albumine de sérum bovin à 2% a ensuite été déposée sur les coupes pendant 1h afin de bloquer les sites non spécifiques. Entre chaque étape, les lames étaient rincées dans du tampon phosphate salin (PBS) 1X. Les lames ont ensuite été incubées avec les anticorps (Ac) primaires appropriés selon les conditions décrites dans le Tableau 12.

Pour les marquages en IHC, les lames ont par la suite été mises en contact avec un Ac secondaire universel biotinylé (sauf pour l'Ac primaire biotinylé anti-CXCR4), pendant 1h à température ambiante, puis avec de la streptavidine-horseradish peroxidase, 30 minutes à température ambiante (kit LSAB, Dako). Enfin, du DAB a été ajouté (substrat de la peroxydase) à l'abri de la lumière, 2 à 5 minutes et une contre-coloration par l'hématoxyline de Harris a été effectuée.

Pour les marquages en IF, les lames ont été incubées avec de la streptavidine ou un Ac secondaire couplé à un fluorochrome, comme décrit dans le Tableau 12, pendant 1h à température ambiante. Puis, le second anticorps primaire a été ajouté selon les conditions spécifiques. Après un nouveau lavage par PBS, le second Ac secondaire ou la streptavidine

conjugués à un fluorochrome a été ajouté en combinaison avec du Dapi (1/500e), afin de colorer les noyaux, 1h, à température ambiante.

Pour chaque marquage, des contrôles négatifs ont été réalisés, par incubation des lames en présence d'un anticorps isotypique, apparié à l'espèce et à la concentration de(s) (l') anticorps primaire(s) considéré(s).

L'analyse histologique permettant de classer les lésions en fonction de leur stade a été effectuée par 2 investigateurs indépendants (Dr A Carlotti et moi-même), après coloration par hématoxyline et éosine.

Tableau 12 : Anticorps et conditions utilisées en immunohistochimie et immunofluorescence

Protéine	Procédure	Espèces	Clone/ Type	Dilution	Incubation	Origine	Isotype
CXCL12	IHC	Souris	K15C IgG2a	10 µg/ml	4°C sur la nuit	Institut Pasteur (U819 Inserm)	Souris IgG2a BD Pharmigen
	IF[1]	Lapin	Poly-clonal	0,5 µg/ml	4°C sur la nuit	Abcam	Lapin polyclonal R&D System
CXCR4	IHC/IF[2]	Souris	12G5-Biot IgG2a	15 µg/ml	4°C sur la nuit	eBioscience	Souris biotinylated-IgG2a BD Pharmigen
CXCR7	IHC	Souris	11G8 IgG1	10 µg/ml	Température ambiante 2h	R&D System	Souris IgG1 BD Pharmigen
	IF[1]	Lapin	Poly-clonal	3,3 µg/ml	Température ambiante 2h	Proteintech	Lapin polyclonal R&D System
LANA	IHC/IF[3]	Souris	13B10 IgG1	5 µg/ml	Température ambiante 2h	Leica Biosystems	Souris IgG1 BD Pharmigen
Ki67	IHC/IF[3]	Souris	MIB1 IgG1κ	0,8 µg/ml	Température ambiante 2h	Dako	Souris IgG1 BD Pharmigen
VEGF	IHC	Souris	IgG2B	1,25 µg/ml	4°C sur la nuit	R&D System	Souris IgG2B R&D System

Abréviations: IHC: marquage immunohistochimique, IF: immunofluorescence, Biot: biotinylé, LANA: human herpesvirus-8 latency-associated nuclear antigen, VEGF: vascular endothelial growth factor
Details des anticorps secondaires utilisés pour les doubles-marquages en IF : les anticorps étaient marqués par un fluorochrome : [1]Anticorps de chèvre anti-lapin conjugué à de l'Alexa Fluor 488 (Invitrogen), [2] Streptavidine conjuguée à de l'Alexa Fluor 488 (Invitrogen), [3] Anticorps de chèvre anti-souris conjugué à de l'Alexa Fluor 594F (Invitrogen)

B. Quantification protéique

Les quantifications des expressions protéiques de CXCL12, CXCR4, CXCR7, LANA, Ki67 et VEGF par les cellules endothéliales et SC des lames, ont été effectuées en se basant sur le système de gradation du Groupe Sarcome Français de la Fédération Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer (517). Les lames ont été numérisées à l'aide d'un microscope HPF-NanoZommer® 2.0-HT (Hamamatsu, Massy, France), puis analysées à l'aide du logiciel Visilog® 7.0 (Noesis, Gif-sur-Yvette, France). Deux algorithmes informatiques ont été créés afin de détecter les marquages nucléaires et cytoplasmiques et de permettre une quantification semi-automatique des cellules colorées ou non. Pour un marquage donné, toutes les images ont été acquises et analysées avec les mêmes réglages, l'isotype contrôle permettant d'éliminer le bruit de fond. Deux investigateurs indépendants (F. Gaudin et moi-même), ont analysé en aveugle les différentes lésions. Les zones les plus

fortement marquées ont été sélectionnées à un grossissement X250. Les zones de stroma tumoral ou dépourvues de cellules endothéliales ont été exclues. Le pourcentage de cellules endothéliales et SC positives a été déterminé pour chaque protéine, sur 10 champs consécutifs au grossissement X400 en partant des zones les plus fortement marquées. Le pourcentage de cellules positives correspond au nombre de cellules positives par rapport au nombre total de cellules sur les 10 champs consécutifs.

C. **Dosages des cytokines plasmatiques**

Les prélèvements sanguins des patients ont été collectés dans des tubes héparinés, selon le calendrier précisé en Tableau 9, ou dans le cadre du suivi immunovirologique d'une infection par le VIH ou de dons de sang. Ils ont ensuite été centrifugés à 1 000g, pendant 15 minutes, le plasma a été récupéré puis, de nouveau centrifugé à 10 000g, pendant 10 minutes, à 2-8°C, pour assurer une élimination complète des plaquettes. Les échantillons ont été conservés à -80°C, jusqu'aux analyses.

Les concentrations plasmatiques de CXCL12 ont été mesurées en double pour chaque échantillon provenant des témoins et des patients à l'inclusion et à l'arrêt du traitement par lénalidomide, par méthode ELISA, à l'aide du kit Quantikine® Human CXCL12/SDF-1α (R&D Systems), en suivant les recommandations du fabricant.

Les concentrations d'IFN-γ, TNF-α, VEGF-A, IL-1β, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 et IL-17A ont été déterminées en double par la technique V-Plex (Meso-Scale Discovery), en se référant aux instructions du fabricant. Cette technique de microdosage multiplex par électrochimioluminescence, repose sur la fixation sur microplaque d'Ac de capture spécifiques, multiples et sur l'utilisation d'Ac de détection, couplés à une balise électrique. La détection se fait par chimioluminescence et permet de doser de multiples cytokines. Cette technique est plus sensible que la détection par méthode chromogène ELISA traditionnelle. L'acquisition des données a été effectuée au sein de la plateforme cytométrie et immunobiologie Cybio, de l'Institut Cochin (Paris, France).

Les limites inférieures de quantifications étaient les suivantes : 0,02 pg/mL pour l'IL-4, 0,03 pg/mL pour l'IL-10, 0,04 pg/mL pour le TNF-α, l'IL-1β et l'IL-8, 0,06 pg/mL pour l'IL-6, 0,11 pg/mL pour l'IL-12p70, 0,20 pg/mL pour l'IFN-γ, 0,74 pg/mL pour l'IL-17A, 1,12 pg/mL pour le VEGF-A et 156,00 pg/ml pour CXCL12. Par convention pour les analyses statistiques, les concentrations en dessous de la limite de quantification se sont vues attribuer la valeur : « limite de quantification/2 ».

D. **Dosages des ARV et du lénalidomide**

Les concentrations plasmatiques d'ARV et de lénalidomide des patients de l'essai et des témoins VIH sans MK ont été mesurées au sein du laboratoire de pharmacologie clinique des antiviraux de l'hôpital Bichat-Claude Bernard, par chromatographie liquide ultra haute performance couplée à la spectrométrie de masse (UPLC-MS/MS, Waters Acquity® UPLC and TQD, Milford, MA, USA), en se basant sur des techniques précédemment validées (518, 519). Les concentrations plasmatiques résiduelles d'INNTI et d'IP étaient considérées comme adéquates si elles correspondaient à celles préconisées dans le rapport Morlat 2013 actualisé en 2014 (520) ; soit entre 1000 et 4000 ng/mL pour l'efavirenz, >200 ng/mL pour l'atazanavir, >2000 ng/mL pour le darunavir et >4000 ng/mL pour le lopinavir. Selon les données disponibles dans la littérature, les concentrations résiduelles de ténofovir, raltégravir et lénalidomide considérées comme adéquates étaient respectivement comprises entre 22 et 66 ng/mL (521), > à 15 ng/mL (522) et entre 3 et 20 ng/mL (519).

E. **Analyses statistiques**

Les variables continues sont présentées sous la forme de médiane (interquartiles ou bornes) et les variables catégorielles sous la forme de pourcentage. Les variations des paramètres mesurés à l'inclusion et à l'arrêt du lénalidomide ont été comparées à l'aide de tests de rangs signés de Wilcoxon. Les associations entre les variables continues ont été évaluées à l'aide du test de corrélation de Spearman. Les variations de concentrations des chimiokines entre les patients progressant ou ceux ne progressant pas sous lénalidomide ont été évaluées à l'aide du test non paramétrique de Mann-Whitney. La méthode de Kaplan-Meier a été utilisée afin d'estimer la survie sans progression. Le temps passé sans progression était considéré comme celui entre le début du traitement par lénalidomide et la date du premier évènement témoin d'une progression de la maladie ou le décès du patient.

Pour la quantification protéique, afin de tenir compte de la disponibilité de plusieurs biopsies pour certains patients, nous avons utilisé la technique des *bootstraps*. Cent *bootstraps* ont été générés pour chaque patient, puis une valeur a été choisie de façon aléatoire parmi les différents *bootstraps* pour les patients ayant au moins 2 valeurs. Puis un test non paramétrique de Mann-Whitney a été utilisé pour comparer les variables continues entre chaque groupe de patients. L'ensemble des tests était en bilatéral et la significativité statistique était présumée pour des valeurs de $p<0,05$. Toutes les analyses ont été effectuées avec le logiciel de statistique IBM SPSS version 22.0 pour Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), celles relatives à la réponse au traitement, à l'évolution des paramètres biologiques et virologiques

et à la tolérance ont été effectuées en collaboration avec Mr L. Assoumou du centre de méthodologie et de gestion, INSERM UMR_S943, les autres analyses ont été réalisées par moi-même, puis validées par Mr L. Assoumou.

Résultats

« Tout est poison, rien n'est poison, seule la dose compte »

Paracelse

1) Impact d'un traitement par lénalidomide sur l'évolution de la maladie de Kaposi chez des patients infectés par le VIH : ANRS 154 Lenakap

A. Rationnel

La MK est une tumeur cutanée viro-induite, répandue à travers le monde et parmi les plus fréquentes chez les patients infectés par le VIH (125, 352). Bien que le nombre de cas de MK-VIH nouvellement diagnostiqués ait diminué de plus de 70% depuis l'introduction des combinaisons d'ARV, la MK reste l'un des 2 premiers cancers rapportés chez les patients infectés par le VIH (125, 333, 523, 524).

Cette pathologie multifactorielle repose sur la présence du virus HHV-8 et celle d'un microenvironnement riche en cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, TNF-α, IFN-γ, etc.) et en facteurs impliqués dans l'angiogenèse (VEGF), dans un contexte d'immunosuppression pour au moins 2 formes de MK : la MK-VIH et la MK-iatrogène (10, 525). Ces derniers jouent un rôle dans l'apparition, la prolifération et la progression tumorale.

La prise en charge thérapeutique de la MK-VIH repose actuellement sur l'utilisation de combinaisons d'ARV, plus ou moins associées à des mono ou polychimiothérapies cytotoxiques. Ces dernières permettent d'atteindre des taux de réponse compris entre 20 et 80 %, aux prix d'effets indésirables et d'interactions médicamenteuses complexes (2, 367, 385, 406, 407, 526, 527). Les rechutes à l'arrêt du traitement étant fréquentes, l'utilisation des chimiothérapies au long cours est souvent nécessaire, entrainant des toxicités cumulatives, des interactions, une diminution de la qualité de vie des patients et une mobilisation des ressources hospitalières, notamment pour la préparation et l'administration des produits cytotoxiques. A l'heure actuelle, aucun traitement par voie orale n'a prouvé son efficacité dans la MK-VIH. Il existe donc une justification éthique et de Santé Publique, à l'étude de nouvelles stratégies thérapeutiques par voie orale dans cette indication.

Dans le passé, des études ont souligné l'impact positif d'un traitement par thalidomide, un agent immunomodulateur administré par voie orale, aux propriétés anti-TNF-α et anti-angiogéniques, dans la MK (500-506). Des cas rapportés et des essais cliniques de phase II ont montré une inhibition de la réplication d'HHV-8 et une régression de la MK chez 34 à 47% des patients traités. Cependant, l'utilisation de cette molécule a été limitée par les effets indésirables fréquemment décrits par les patients, telles des neuropathies périphériques,

problèmes de constipation, somnolence/asthénie, anxiété/dépression ou encore la survenue de réaction d'hypersensibilité.

Le lénalidomide, un dérivé de deuxième génération du thalidomide, approuvé dans la prise en charge du myélome multiple et des syndromes myélodysplasiques, est une molécule aux caractéristiques pharmacologiques et au profil de tolérance améliorés par rapport à la molécule mère (528-532). Il inhibe notamment la sécrétion de TNF-α, d'IL-1, IL-6, IL-12 et de VEGF et induit celle de l'IL-8, IL-10 et de l'IFN-γ. Ses propriétés immunomodulatrices, anti-inflammatoires et anti-tumorales directes sont supérieures à celles du thalidomide, tandis que le risque de neuropathies périphériques est réduit (482, 483, 528-535). Cette molécule apparaît comme une stratégie thérapeutique prometteuse dans la prise en charge de la MK. En effet, 4 cas de MK-VIH, régressant suite à la mise sous lénalidomide ont été rapportés, avec une très bonne tolérance, ouvrant ainsi la voie à de nouvelles études prospectives (498, 499, 536).

Dans ce contexte, le but de notre étude a été d'explorer l'efficacité du lénalidomide dans un essai clinique de phase II, multicentrique, en ouvert, chez des patients atteints d'une MK-VIH. Ces derniers étaient contrôlés sur le plan immunovirologique, traités efficacement par ARV depuis plus de 6 mois, sans avoir répondu à une ou plusieurs lignes antérieures de chimiothérapies. L'efficacité à 24 et 48 semaines de traitement a été évaluée selon le score PGA et les critères ACTG, à la fois par l'investigateur, le patient et rétrospectivement par un comité indépendant, à partir de photographies des 4 à 6 lésions index sélectionnées. Nous avons également analysé la variation des paramètres biologiques et virologiques des patients (taux de CD4, CD8, ratio CD4/CD8, taux d'hémoglobine, clairance de la créatinine, taux de plaquettes, leucocytes, polynucléaires neutrophiles, charges virales VIH et HHV-8) et l'observance des patients (nombre de gélules consommées par rapport au nombre délivré). L'amélioration des connaissances sur la physiopathologie de la MK reste nécessaire. Dans ce contexte, mon travail a consisté à évaluer par technique de dosages multiplex, l'évolution des taux plasmatiques de cytokines et facteurs de croissance connus pour être impliqués dans la MK ou au contraire jamais explorés dans cette pathologie, à savoir l'IFN-γ, le TNF-α, le VEGF-A, l'IL-1β, l'IL-4, l'IL-6, l'IL-8, l'IL-10, l'IL-12p70 et l'IL-17A, chez les patients, au cours de l'essai. J'ai également participé, en collaboration avec le centre de méthodologie et de gestion INSERM UMR_S943, à l'examen des notifications de pharmacovigilance, afin d'estimer la tolérance clinique et biologique des patients au lénalidomide (tous les patients ayant reçu au moins une dose de lénalidomide ont été évalués pour la tolérance). Enfin, j'ai participé à l'étude pharmacologique des concentrations plasmatiques de lénalidomide et

d'ARV, par analyse en UPLC-MS/MS. Cette étude avait pour but d'évaluer les interactions potentielles entre le lénalidomide et les ARV, jusque là très peu étudiées, afin de répondre aux problématiques d'adaptation thérapeutique spécifique aux patients traités par ARV.

B. **Article 1 : Exposé des travaux**

Phase II trial of lenalidomide in patients with HIV-associated Kaposi's sarcoma receiving antiretroviral therapy: Results of the ANRS 154 Lenakap Trial

V. Martinez-Pourcher, A. Desnoyer, L. Assoumou, C. Lebbé, A. Curjol, AG. Marcelin, F. Cardon, S. Gibowski, D. Salmon-Céron, JM. Chennebault, I. Poizot-Martin, G. Peytavin, F. Boué and D. Costagliola and the ANRS 154 Lenakap Trial Group

Manuscrit soumis pour publication dans HIV Medicine

Phase II trial of lenalidomide in patients with HIV-associated Kaposi's sarcoma: Results of the ANRS 154 Lenakap Trial

Running Head: Lenalidomide in HIV-associated Kaposi sarcoma

V. MARTINEZ-POURCHER [1,2,3], A. DESNOYER [3, 4, 5] *, L. ASSOUMOU [6,7] *, C. LEBBE [8,9,10], A. CURJOL [6,7], AG. MARCELIN [6,7,11], F. CARDON [12], S. GIBOWSKI [13], D. SALMON-CERON [14], JM. CHENNEBAULT [15], I. POIZOT-MARTIN[,17,18], G. PEYTAVIN [5,19,20], F. BOUE [3,4,21]* and D. COSTAGLIOLA [2,6]* and the ANRS 154 Lenakap Trial Group

* contributed equally to this work

[1] Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Service de Maladies Infectieuses et Tropicales, Paris, F-75013 France

[2] Sorbonne Universités, UPMC Paris Univ 06, Paris, France

[3] INSERM UMR-S996, Clamart, F-92140 France

[4] Univ Paris Sud, INSERM UMR- S996, Clamart, F-92140 France

[5] Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Bichat-Claude Bernard, Département de pharmaco-toxicologie clinique, Paris, F-75018 France

[6] Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, Institut Pierre Louis d'Epidémiologie et de Santé Publique, Paris, France

[7] INSERM, UMR-S1136, Institut Pierre Louis d'Epidémiologie et de Santé Publique, Paris, France

[8] Assistance Publique Hopitaux de Paris, Hôpital Saint Louis, Univ Paris Diderot, France

[9] Univ Paris Diderot, INSERM U976, France

[10]INSERM U976, CIC et Dermatologie, Univ Paris Diderot, France

[11] Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Laboratoire de Virologie, Paris, F-75013 France

[12] ANRS (France REcherche Nord&Sud Sida-hiv Hépatites), Clinical and therapeutic research on HIV/AIDS office, Paris, France.

[13] ANRS (France REcherche Nord&Sud Sida-hiv Hépatites), Clinical research safety office, Paris, France.

[14] Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Groupe Hospitalier Cochin, Service des Maladies Infectieuses, Paris, F-75005 France

[15] Service de Maladies Infectieuses et Tropicales, CHU Angers, F-49000 France

[16] APHM Sainte-Marguerite, Service d'Immuno-hématologie clinique, Marseille, France

[17] Université Aix Marseille, France

[18] Inserm U912 (SESSTIM), Université Aix Marseille, Marseille, France

[19] Université Paris Diderot, INSERM, IAME UMR 1137, Paris, F-75018 France

[20] INSERM, IAME UMR 1137, Paris, F-75018 France

[21] Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Antoine Béclère, Service de Médecine Interne et Immunologie Clinique, Clamart, F-92140, France

Correspondence: Dr Valérie Martinez-Pourcher

Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Service de Maladies Infectieuses et Tropicales, 45-83 bd de l'hôpital, Paris, F-75013 France

Abstract: 247

Words: 3480

Tables: 3

Figures: 2

Abstract

Purpose

Lenalidomide, an oral immunomodulating agent, has shown promising activity in HIV-infected individuals with Kaposi's sarcoma (KS).

Methods

This single-arm, multicenter, open-label, Gehan's two-stage phase II trial evaluated the efficacy and safety of lenalidomide in HIV-infected patients with progressive KS despite previous chemotherapy (NCT01282047, ANRS 154 Lenakap trial). The primary endpoint was the rate of partial or complete responses (PR/CR) at W24, evaluated by both the study investigators and the patients using the Physical Global Assessment (PGA). The data and safety monitoring board recommended that enrollments be halted on 24 April 2013 because of a lack of responses.

Results

We enrolled 12 antiretroviral-treated HIV-infected men with progressive KS despite previous chemotherapy. Their HIV plasma viral load was <50 copies/mL and their median CD4 cell count 444/mm^3. One patient stopped taking lenalidomide because of hives at W1 and a second patient died at W7. The remaining 10 patients were assessable at W24, when none had PGA-defined CR or PR and one had ACTG-defined PR. There were no additional PGA responses at week 48, but an additional 3 patients had ACTG responses, for a total of 4 patients with ACTG PR at week 48 (40%; 95% confidence interval: 12.2-73.8). Fourteen grade 3-4 adverse events were considered at least possibly related to lenalidomide during a total of 101 cycles.

Conclusion

Lenalidomide was well tolerated in antiretroviral experienced patients with progressive KS

previously treated with chemotherapy. The ACTG-defined response rate at W48 was 40%, while it was 0% using PGA criteria.

This trial was sponsored and funded by ANRS and conducted with the support of Celgene.

Key-words: Kaposi sarcoma, HIV, lenalidomide, efficacy, safety, cytokines, pharmacokinetic

Introduction

Kaposi's sarcoma (KS) is one of the most common solid tumors in HIV-infected individuals[1,2], although its incidence has fallen by more than 70% since the introduction of combined antiretroviral therapy in industrialized countries (cART)[1,3,4].

KS is due to human herpesvirus type 8 (HHV-8), which provokes angiogenesis and induces proinflammatory cytokine production (interleukin (IL)-1, IL-6, tumor necrosis factor (TNF)-α, and interferon (IFN)-γ)[5,6]. Combined antiretroviral therapy and/or cytotoxic chemotherapy are the standard treatments for KS associated with HIV infection (HIV-KS), giving response rates of 20% to 76% but troublesome adverse effects[7-13]. Long-term chemotherapy is often necessary, resulting in cumulative toxicity, risk of drug-drug interactions, and negative impact on quality of life. There are no oral drugs with proven efficacy in KS.

Thalidomide, an oral immunomodulating agent, has anti-TNF-α and anti-angiogenic activities. Previous case reports and phase II studies showed inhibition of HHV-8 replication and KS regression in 34% to 47% patients treated with thalidomide[14-18], but use of this drug is limited by its frequent adverse effects. Lenalidomide, a second-generation thalidomide derivative approved in patients with myelodysplastic syndromes and myeloma, is more potent and avoids many of the serious adverse effects, including neuropathy[19-23]. Lenalidomide is an immunomodulatory drug with anti-angiogenic, direct antitumoral and immunostimulatory properties[19-28]. It inhibits TNF-α, IL-1, IL-6, IL-12 and VEGF expression and increases IL-8, IL-10 and IFN-γ production[26,29]. Reports of some cases of HHV-8 diseases suggest that lenalidomide can induce tumor regression and is well tolerated, thus warranting prospective studies[30-32].

Here we evaluated the efficacy and safety of lenalidomide in a multicenter, open-label, phase II trial in HIV-infected patients with previously treated KS and plasma viral load (pVL) <50 copies/mL (ANRS 154 Lenakap study).

Patients and methods

Study design

This single-arm, multicenter, open-label, Gehan's two-stage phase II trial was designed to evaluate the efficacy and safety of lenalidomide after 24 weeks in patients with controlled HIV infection and progressive KS despite previous chemotherapy. The trial conformed to good clinical practices and to the Declaration of Helsinki. The institutional review board of Paris Ile de France VII approved the study, and all the patients gave their written informed consent before participating. The study is registered in ClinicalTrials.gov (NCT01282047, ANRS 154 Lenakap).

Patients

The following patients were eligible: HIV-infected men and non-breastfeeding women with a negative βHCG test, aged between 18 and 75 years with progressive biopsy-proven KS, failure or relapse after one or more lines of anti-KS chemotherapy, HIV pVL <50 copies/mL whatever the CD4 cell count, ongoing cART for at least 12 months, and a Karnofsky index >70%. Eligible patients were required to respect wash-out periods of at least 4 weeks for specific KS chemotherapy and 8 weeks for IFN-α therapy.

Patients were not eligible if they had only visceral, cardiac and/or bronchopulmonary KS, two pVL values > 50 copies/mL during the past 6 months, ongoing infections, heart disease, Castleman's disease, cancers, previous or current hematological malignancies, grade >2 polyneuritis, SGOT or SGPT > 3 normal values, neurotoxic drug therapy, polymorphonuclear neutrophil count <1000/mm^3, platelet count < 75 000/mm^3, life expectancy less than 2 months, creatinine clearance ≤ 50 mL/min, concomitant antineoplastic drug therapy, known allergy or hypersensitivity to lenalidomide and/or thalidomide, or a contraindication to anticoagulation.

Study treatments

The recommended starting dose of lenalidomide was one 25 mg capsule on days 1 to 21 followed by a 7-day wash-out period every 28 days, repeated for 24 weeks. From W24, lenalidomide was stopped in case of disease progression, and the patients were followed until W48. Lenalidomide was to be continued for a further 12 weeks in case of complete remission (CR), and for 24 weeks in case of partial remission (PR) or stable disease. Lenalidomide was provided by Celgene (France) as 5 and 25 mg hard capsules.

As recommended in the lenalidomide summary of product characteristics in the granted market organisations, aspirin was given to prevent thromboembolic events. Anticoagulation at therapeutic doses was preferred to aspirin for patients with a history of pulmonary embolism or deep venous thrombosis, or with relevant risk factors. The lenalidomide dose could be adapted in case of skin rash, thrombocytopenia, renal impairment or neutropenia (5, 10 or 15 mg). Granulocyte colony-stimulating factors could be prescribed in case of neutropenia.

Follow-up

After screening (less than 4 weeks before treatment initiation), study evaluations were performed at D0 (baseline), W1 and 4, and every 4 weeks thereafter until W48. At each visit, the patients had a routine safety assessment, pVL and CD4 cell measurements and blood sampling. The total number of lesions was recorded at screening, and 4-6 index lesions were chosen to be evaluated by the study investigator and the patient at each visit, and retrospectively by the validation committee on digital photographs; the type and location of the index lesions were recorded. The procedure to take pictures was standardized as described in an annex of the protocol. The Physical Global Assessment (PGA) was used both by the study investigators and the patients to score the index lesions. Degree of infiltration and size of the index lesions were assessed by the study investigator. A 100% decrease in the PGA

score for an index lesion was considered to represent CR, 51-99% PR, 26-50% a slight improvement, an increase or decrease of less than 25% stable disease, and an increase of 25% or more progression (supplemental data). The final response was evaluated on the basis of the index lesion with the poorest response. ACTG criteria were also used[33].

HHV-8 viral load was determined at D0, W4, W12 and W24. HHV-8 genome detection was based on real-time PCR as described elsewhere[34]. Adverse events were recorded at each visit and graded with the ANRS scale (France Recherche Nord & Sud Sida-HIV Hépatites). The investigators evaluated the causal relationship with the study treatment.

Cytokine assays

Blood was collected in heparinized tubes at baseline and each month during the study. Plasma specimens were stored at -80°C until analysis. Plasma samples obtained at W0, 24 and 48 were used for cytokine assays and pharmacokinetic studies.

Plasma concentrations of IFN-γ, TNF-α, VEGF-A, IL-1β, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 and IL-17A were measured in duplicate with a multiplex electrochimioluminescence assay (V-Plex™ Custom Human Cytokine Assay; Meso-Scale Discovery) according to the manufacturer's protocol, using 25 µL of plasma from each time point. Data acquisition was performed by the Cochin Cytometry and Immunobiology Facility (Paris, France). The lower limits of quantification (LOQ) were 0.02 pg/mL for IL-4, 0.03 pg/mL for IL-10, 0.04 pg/mL for TNF-α, IL-1β and IL-8, 0.06 pg/mL for IL-6, 0.11 pg/mL for IL-12p70, 0.20 pg/mL for IFN-γ, 0.74 pg/mL for IL-17A and 1.12 pg/mL for VEGF-A. By convention, concentrations below the LOQ were defined as LOQ/2 for statistical analysis.

Pharmacokinetic study

Plasma concentrations of ARV drugs[35] and lenalidomide[36] were determined by using two validated ultrahigh-performance liquid chromatography methods coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS, Waters Acquity® UPLC and TQD, Milford, MA, USA).

Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI), protease inhibitor (PI), plasma trough concentrations (C12h or C24h) were considered adequate if they matched the concentrations proposed by French national guidelines for antiretroviral therapy of HIV-1 infection in adults[37]: 1000 to 4000 ng/mL for efavirenz, 200 ng/mL for atazanavir, 2000 ng/mL for darunavir, 4000 ng/mL for lopinavir. Based on published data, lenalidomide[36] , raltegravir[38] and tenofovir[39] C24h values were considered adequate if 3-20 ng/mL, 15 ng/mL and 22-66 ng/mL respectively.

Endpoints

The primary endpoint was the proportion of patients with a partial or complete response at week 24, as evaluated by both the study investigators and the patients using the PGA score for the 4-6 index lesions. A validation committee judged each patient's outcome from all available photographs. In case of discordant judgments, the validation committee evaluation was retained.

Secondary endpoints included the proportion of patients with a PGA-defined partial or complete response at week 48; the percentage change from baseline in the sum of the surface areas of the 4-6 index lesions at weeks 24 and 48 (ACTG criteria); the change from baseline in plasma HIV pVL, HHV-8 pVL, CD4 and CD8 cell count, CD4/CD8 ratio at week 48, hemoglobin level, creatinine clearance, platelet, leukocyte and neutrophil counts, in cytokine and drugs levels, KS-progression-free survival at week 48 (an event was defined as disease progression or death), clinical and biological tolerability of lenalidomide and treatment

adherence (number of pills consumed divided by the number of pills received).

Statistical analysis

The sample size was chosen as in a typical Gehan's two-stage phase II trial. Fourteen assessable patients were required in the first step. If no response was observed in the 14 assessable patients, we could exclude, with a type 1 error of 5%, a response rate higher than 20%; if one response (partial or complete) was observed, other patients could be included up to a total of 25 assessable patients. Patients who discontinued the study before primary endpoint evaluation were replaced by other patients in order to reach the target sample size.

The DSMB recommended that inclusions in the study be prematurely discontinued on 24 April 2013 after 12 individuals had been enrolled, because of a lack of complete and partial responses. The patients already included were followed until W48 as originally planned.

The primary efficacy endpoint was assessed for all assessable patients. Patients who died of KS-unrelated causes prior to the response evaluation or who withdrew from the study were not assessable. Patients who prematurely discontinued the study treatment but remained in the study were included in the efficacy analysis. All patients who received at least one dose of study treatment were included in the safety analysis.

Data were summarized as proportions for categorical variables, and median/range for continuous variables. Changes in continuous variables between baseline and W48 were compared using the Wilcoxon paired test, and the non-parametric Spearman correlation test was used to study associations between continuous variables. The Mann-Whitney non-parametric test was used to compare changes in cytokine levels between patients with progression and those with stable disease or improvement at W48. The Kaplan-Meier method was used to estimate the progression-free survival rate. Events were defined as disease progression or death before W48. Time to an event was defined as the time between the date

of lenalidomide initiation and the date of the event. All reported P values are two-tailed, and significance was assumed at $p<0.05$. All analyses were performed with IBM SPSS statistics software version 22.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Results

Patient disposition and characteristics

We enrolled 12 men with HIV-related biopsy-proven KS among 15 patients screened in 9 French hospitals between November 2011 and February 2013 (Figure 1).

Baseline characteristics of the 12 patients are shown in Table 1. All the patients had cutaneous KS, with a median of 21 lesions, and one patient also had visceral involvement (gastrointestinal tract). The patients had received between 1 and 13 courses of previous chemotherapy regimens during a median period of 16 months. The most commonly used drug classes were anthracyclines (13 doxorubicin, 3 pegylated-doxorubicin, 5 daunorubicin), cytotoxic antibiotics (13 bleomycin), vinca alkaloids (3 vinblastine, 3 vincristine), taxanes (6 paclitaxel, 2 docetaxel), 2 thalidomide, and 4 IFN-α. Two patients had also received radiotherapy. None of the patients had hepatitis B and C virus coinfection. All had normal clotting status at screening, and two had a past history of thromboembolism. Although the protocol required a Karnofsky performance status >70%, a derogation was granted to the patient with visceral involvement (Karnofsky index 60%) (Figure 1).

Study treatment and efficacy

Two of the 12 enrolled patients discontinued the study, one on day 7 because of hives and one on day 13 because of acute renal failure in a context of chronic renal disease. The latter patient had gastrointestinal involvement and died at week 7 (Figure 1). This patient had a high tenofovir plasma trough concentration at baseline (C24h = 305 ng/mL). The remaining ten patients were assessable at W24. One patient (#4) had a lenalidomide dose reduction (15 mg/d) because of a rash during the first cycle, and this dose was maintained through W48. Three patients (#2, 10 and 11) stopped the study treatment because of disease progression at W16, W24 and W28, as evaluated by the study investigator and the patients themselves.

Disease progression was confirmed by the ACTG score, with an increase of ≥25% in the size of the index lesions at W24. All three patients had detectable HHV-8 viral load: patient #10 had respectively <10, 1819, 7133 and 709 copies/150 000 cells at W0, W4, W12 and W24; patient #2 had <10, 28, <10 and <10 copies/150 000 cells; and patient #11 had 998, 15 365, 2090 and 27 877 copies/150 000 cells. This last patient withdrew from the study on being diagnosed with multicentric Castleman's disease. This diagnosis was raised early after inclusion and confirmed during follow-up. Poor adherence was suspected in this case, as the HIV pVL was 54 copies/mL at W4, the plasma ARV trough concentrations were below the LOQ at W12, and lenalidomide pill consumption was below 90%.

At week 24, based on the investigator and patient assessments (Table 2), there were no partial or complete responses among the 10 assessable patients (95%CI: 0-31%). This was confirmed by the validation committee. Based on ACTG criteria, one patient (#3) had a PR at W24 (10%, 95%CI: 0.2-44.5%), with a 58% reduction in the total surface area of his index lesions. There were no additional responses at week 48 according to the investigator and patient assessments, while ACTG criteria showed 3 additional responses. Thus, a total of 4 patients had a PR at W48 (40%; 95%CI: 12.2-73.8%). The estimated KS progression-free survival rate at W48 was 63.6% (95%CI: 35.4-84.8%) (Figure 2).

Biological outcomes

During follow-up, two patients experienced an isolated increase in HIV pVL (54 copies/mL at W4, returning to <50 copies/mL at W8 with no change in cART; and 73 copies/mL at W48). Changes in biological parameters between baseline and W48 are described in Supplemental Data. The only significant changes were a fall in leukocyte and neutrophil counts.

Safety

Lenalidomide was generally well tolerated. The main adverse events were neutropenia, thrombocytopenia and asthenia (Table 3), as mentioned in the summary of product characteristics. During a total of 101 treatment cycles, seven patients experienced 14 grade 3-4 adverse events that the investigators considered at least possibly due to lenalidomide, of which 6 were classified as certainly due to lenalidomide. One patient died at week 7, as noted above.

Cytokine assays

Only IL-8 levels changed significantly between baseline and the end of lenalidomide treatment, with a median change of +0.90 (p=0.028) (Supplemental Data). There was no association between baseline cytokine plasma levels and the change in the total surface area of the KS index lesions at the end of lenalidomide treatment. By contrast, the decrease in IFN-γ and TNF-α plasma concentrations from baseline to the end of lenalidomide treatment was associated with a decrease in the total surface area of the index lesions (r=0.818, p=0.004 for IFN-γ, and r=0.758, p=0.011 for TNF-α). In addition, we observed a significant difference in the change in IFN-γ plasma concentrations (+37 vs -1.6 pg/mL, p=0.017) and IL-10 plasma concentrations (+19.6 vs -0.1 pg/mL, p=0.033) between the 3 patients with disease progression and the 7 patients without disease progression (Supplemental Data). No association was observed between the other cytokines and disease progression.

Drugs plasma concentrations

ARV and lenalidomide trough plasma concentrations (C12h or C24h) were considered adequate during the entire study period. Lenalidomide pill consumption was generally high, as reported in Table 2 with 6 patients consuming more than 95% of lenalidomide pills. Two

patients consumed between 90% and 95% of their pills at in at least one period, and the last two consumed between 86% and 90% in at least one period. We observed no lenalidomide accumulation in plasma, including in patients receiving a P-glycoprotein inhibitor such as ritonavir. One patient (#9) had a low darunavir C24h at W12 and W24 (1164 and 455 ng/mL), probably owing to reduced intestinal absorption, leading to transient low-level viremia (73 copies/mL at W48).

Discussion

We observed no improvement of Kaposi's sarcoma during lenalidomide therapy, as evaluated by both the study investigators and the patients using the PGA score, while ACTG criteria suggested a partial improvement in 40% of patients at W48. No complete responses occurred. The KS-progression-free survival rate at week 48 was 63.6%.

Evaluation of treatment responses in cutaneous KS remains a challenge. The AIDS Clinical Trials Group (ACTG) classification has been widely used since the pre-cART era[8,33]. However, this classification was validated in 1997[33] and new data suggest that, in the cART era, a refinement of the ACTG classification or another prognostic index could be of interest[40,41]. We chose a composite endpoint for this trial of lenalidomide, based on a 7-point PGA score ranging from completely clear to worse, as rated by the study investigators, the patients and a validation committee. The PGA score is frequently used for clinical trials in psoriasis and cutaneous lymphoma, and is an average evaluation of different lesions based on erythema, scaling, and induration[42]. The ACTG classification, used as a secondary endpoint, showed a PR in 1 patient (10%) at W24 and in 4 patients (40%) at W48, corresponding to a ≥ 50% decrease in the total surface area of the index lesions. In previous reports of KS therapy, responses were evaluated with the positron-emission tomography (PET) in addition to conventional evaluation[30,31,43-45]. PET showed a reduction in hypermetabolic abnormalities and confirmed partial or complete responses. This latter method has the advantage of being standardized and reproducible. Use of a clinical index combined with PET could be of interest in KS treatment evaluation and should be considered in future clinical trials. PET was not available in our study.

Lenalidomide was generally well tolerated in our study. Adverse events were comparable to those observed in 14 other clinical trials in hematologic disorders[46]. The most frequent adverse effect was myelosuppression with neutropenia, thrombocytopenia or anemia (33%).

No neurologic toxicity was observed. Adverse effects are reported to be more frequent with conventional KS therapy, the most common (>30%) being myelosuppression, neurologic toxicity, fever, cytolysis, rash, vomiting and hypersensitivity reactions with IFN-α, bleomycin, vinblastine, doxorubicin, daunorubicine, docetaxel and paclitaxel[2,7,8].

The overall response rate (ORR) observed in our trial based on the ACTG criteria was slightly smaller to that reported with conventional intravenous chemotherapies, *e.g.* 61% with vincristine, 48% with bleomycin, and 59% with liposomal pegylated doxorubicin[47-49], and similar to ORR reported for immunomodulatory agents, bevacizumab (31%)[50], matrix metalloproteinase inhibitor COL-3 (29 to 41%)[51], tyrosine kinase inhibitor imatinib (33%)[52], and thalidomide (34 to 47%)[14,16]. It is important to note that our patients had received multiple previous KS therapies. The median progression-free survival time of more than 12 months observed here with lenalidomide was longer than the 8.3 months reported elsewhere with bevacizumab[50], 5.2 months with imatinib[52] and <4 months with historical drugs. Oral lenalidomide allows more convenient administration, avoiding overnight or one-day hospitalization and improving patients' quality of life[53-55]. Moreover, in contrast with many antineoplastic drugs, lenalidomide does not seem to interact with antiretroviral therapy as also observed in the present trial[56]. In a phase II trial of imatinib in HIV-KS, Koon *at al.* observed possible interactions with ARV, potentially resulting in added toxicity[52]. We observed no lenalidomide accumulation in plasma, even in patients receiving P-glycoprotein inhibitors such as ritonavir. These results are consistent with published data[57-59] and support the use of lenalidomide in HIV-infected patients with malignancies such as multiple myeloma. Concomitant use of ARV and conventional chemotherapy can lead to life-threatening interactions with loss of efficacy and/or increased toxicity[60].

KS is a complex multifactorial disease due to an oncogenic virus, HHV-8, and is associated with chronic inflammation in a context of immunodepression. Lenalidomide targets multiple

KS pathways and may thus be of interest in this disease[8,61,62]. Our study is the first to report plasma cytokine concentrations in KS-HIV patients treated with lenalidomide. We observed a substantial increase in the plasma IL-8 level from baseline, in keeping with reports in metastatic malignant melanoma[63]. Despite the known impact of lenalidomide on proinflammatory cytokine production, we observed no fall in TNF-α, IL-1, IL-6 or IL-12 plasma levels[64]. Finally, we found a significantly larger increase in IL-10 and IFN-γ levels in patients with progressive disease than in those with stable or improved disease. These results are consistent with those obtained by Polizzotto *et al.* in multicentric Castleman's disease, suggesting the involvement of IL-10 in KS flares[65].

Pomalidomide is a new thalidomide analog approved in Europe and the USA in 2013 for hematologic diseases[66]. This drug shows better antitumor, immunomodulatory and antiangiogenic properties and fewer adverse effects than thalidomide and lenalidomide[29,66]. Pomalidomide has also shown promising results in a phase I/II study including both 15 HIV-infected patients and 7 uninfected persons, with 20% CR and 40% PR and a median time to response of 8 weeks in HIV-infected patients[67]. In view of the disappointing results obtained here with lenalidomide, pomalidomide should be considered for future trials in HIV-associated Kaposi's sarcoma.

Table 1: Baseline characteristics of the 12 included patients

Variable	Median (range or n (%)
Age (y)	48 (30–68)
Male	12 (100)
Ethnic origin	
- Caucasian	9 (75)
- Sub-Saharan African	3 (25)
HIV transmission group	
- Men who have sex with men	9 (75)
- Heterosexuals	3 (25)
Body mass index, kg/m^2	23.4 (19.5–33.6)
Years since HIV diagnosis	14.3 (2.2–24.8)
Years of antiretroviral treatment	11.5 (2.1–17)
Nadir CD4 cell count per mm^3	197 (13–488)
Pre-HAART CD4 cell count per mm^3	427 (162–1321)
CD4 cell count per mm^3	444 (151–1471)
CD8 cell count per mm^3	779 (408–1299)
CD4/CD8 ratio	0.7 (0.24–1.13)
HIV pVL zenith, log_{10} copies per mL	5.0 (3–5.8)
HIV RNA ≤ 50 copies per mL	12 (100)
cART at screening	
- 2NRTIs+PI/r	7 (58)
- 2NRTIs+NNRTI	2 (17)
- Others (2NRTIs+II, 2NRTIs+PI/r+II, NNRTI+PI/r+II)	3 (25)
Number of Kaposi's cutaneous lesions	21 (7–99)
Number of prior treatments for Kaposi's sarcoma	6 (1–13)
Cumulative duration of prior treatment for Kaposi's sarcoma	17 (3–191)
Number of prior chemotherapy cycles	11.3 (4.5-12)
HHV-8 pVL >10 copies/150 000 cells	2 (101 and 998)
History of thromboembolic disease	2 (17)
Diabetes	0 (0)
Arterial hypertension	3 (25)
Hypercholesterolemia	1 (8)
Hypertriglyceridemia	2 (17)
Hemoglobin, g/dL	14.2 (9.3–14.8)
Creatinine clearance (MDRD), mL/min	104 (56–146)
Platelets, $10^3/mm^3$	234 (158–417)
Leukocytes, $10^3/mm^3$	7.7 (3.8–13.7)
Neutrophils, $10^3/mm^3$	4.1 (2.0–10.2)

Table 2: Responses, as evaluated by both the study investigators and the patients using the physical global assessment (PGA) and *a posteriori* by a validation committee on photographs of 4 to 6 index lesions at week 24 and 48, and on ACTG criteria.

	Investigators	**Patients**	**Committee**	**% change in total surface area of index lesions (ACTG)**		**Lenalidomide pill consumption (%)**		**W24 Response**		**W48 Response**	
Pt#	**W24-W48**	**W24-W48**	**W24-W48**	**W24**	**W48**	**W24**	**W48**	**PGA Primary endpoint**	**ACTG Secondary endpoint**	**PGA Primary endpoint**	**ACTG Secondary endpoint**
1	PR-PR	SD-SI	SD-SD	-12	-55	100	93.9	No	No	No	Yes
2	PD-NE[1]	PD-NE[1]	SD-NE[1]	+55	NE[1]	93.7	NE[1]	No	No	No	No
3	SD-SD	SD-SD	SD-SD	-58	-82	100	86.1	No	Yes	No	Yes
4	SD-SD	SD-SD	SD-SD	+12	+12	100	100	No	No	No	No
5	SD-SI	SD-PR	SD-SD	-17	-49	99.2	99.2	No	No	No	No
6	Study treatment discontinuation on day 13 due to acute renal leading to death at W7										
7	SI-SI	SI-SI	SD-SD	-35	-39	99.2	99.6	No	No	No	No
8	Study discontinuation due to hives on day 7										
9	SD-SD	SD-SD	SD-SD	-40	-52	100	97.2	No	No	No	Yes
10	PD-NE[2]	PD-NE[2]	PD-NE[2]	+31	+50	100	NE[2]	No	No	No	No
11	SD-NE[3]	SD-NE[3]	PD-NE[3]	+25	+16	86.5	88.4	No	No	No	No
12	SD-SD	SD-SD	PD-SD	-37	-51	98.4	99.2	No	No	No	Yes

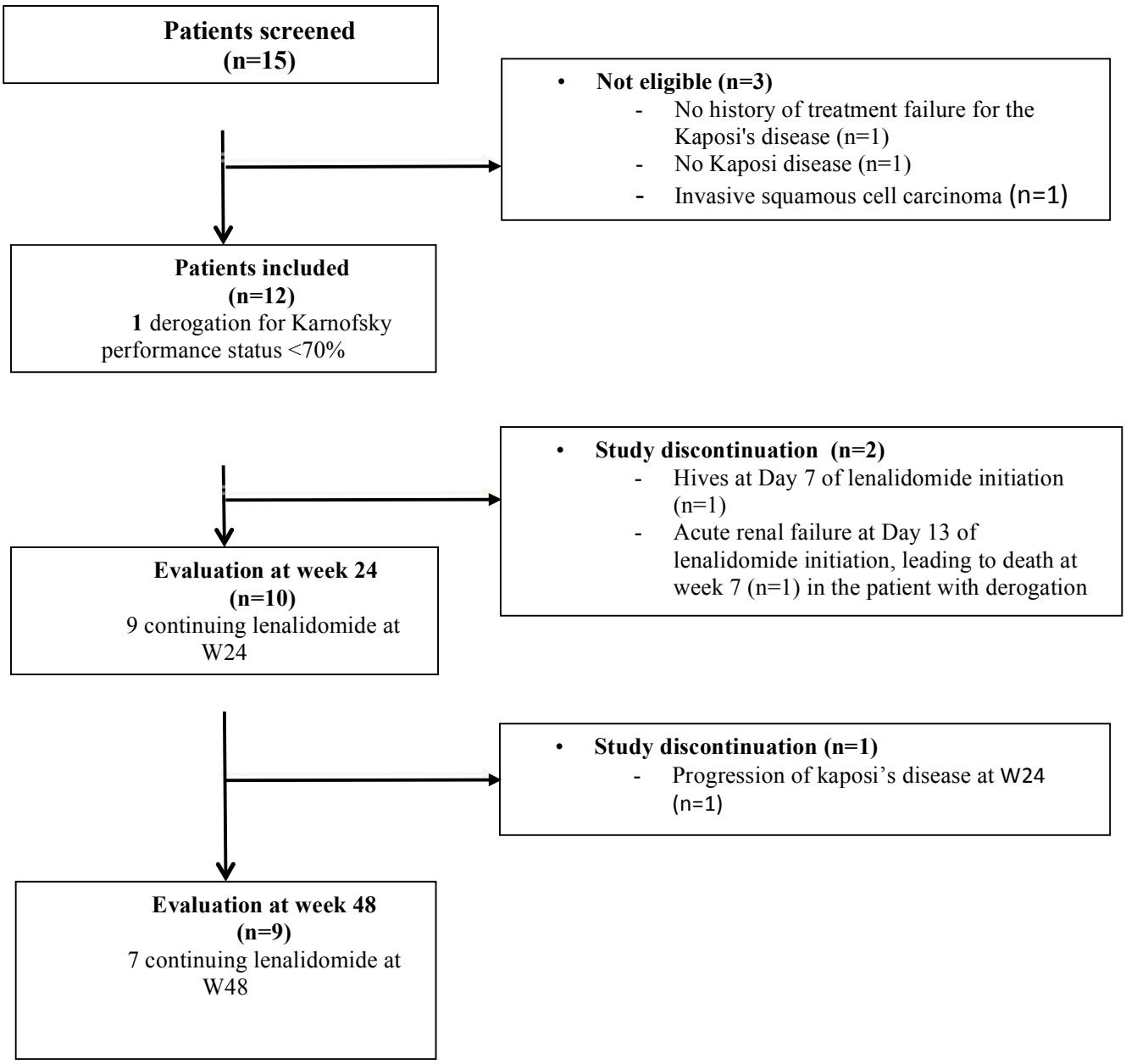
PR: partial response, SI: slight improvement, SD: stable disease, PD: progressive disease
NE[1]: Not assessable, patient left the study at W24 for progression
NE[2]: Not assessable, patient stopped the study treatment at W16 for progression but was followed until W48
NE[3]: Not assessable, patient stopped the study treatment at W28 for progression but was followed until W48

Table 3: Grade 3 or 4 adverse events related to lenalidomide during 101 treatment cycles.

Adverse events	**Related to lenalidomide**			
	Unknown	No	Possibly	Certainly
Neutropenia			1	3
Thrombocytopenia			1	2
Hives				1
Asthenia			3	
Anemia			1	
Acute renal failure			1	
Decrease in left visual acuity			1	
Influenza		1		
Fever		1		
Right inguinal edema with genital extension		1		
Viral gastroenteritis		1		
Anal warts		1		
Acute appendicitis, ulcerative and pyogenic		1		
Deep-tendon reflexes abolished in 4 limbs		1		
Wasting	1			
Castleman disease	1			
Right hyperalgic sciatica	1			
Total	**3**	**7**	**8**	**6**

Worst grade for each adverse event reported in a same patient and considered as the same occurrence is presented in this Table.

Figure 1: Study flowchart



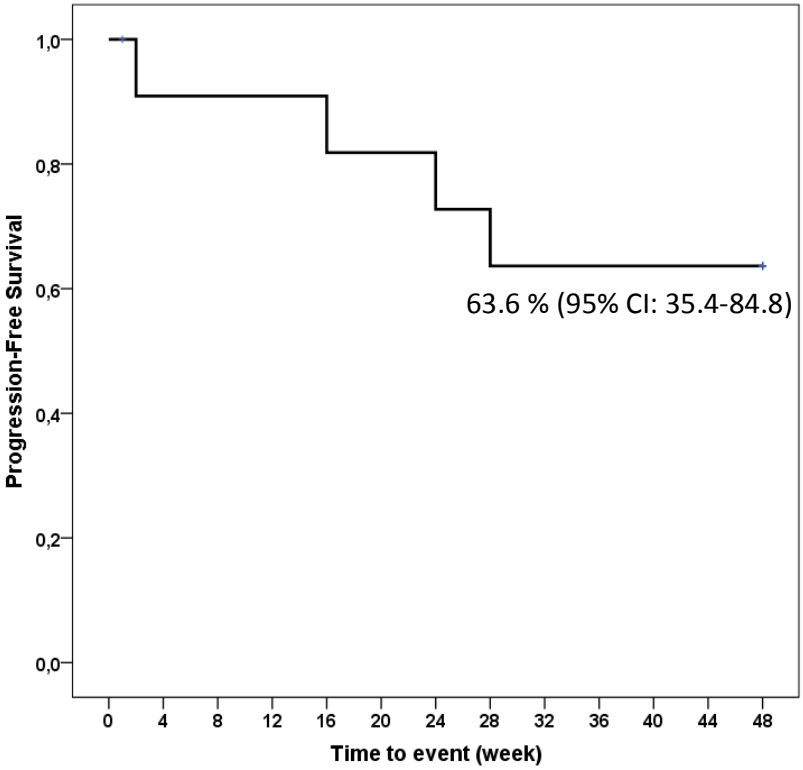


Figure 2: Kaplan-Meier curve of KS-progression-free survival in 12 patients treated with lenalidomide. The patient (#8) who experienced hives at W1 was censored at this time. The four events correspond to: a patient who died (#6), and three patients who experienced disease progression (#2, #10 and #11), as assessed by both the study investigator and the patient.

Acknowledgments

This trial was sponsored and funded by ANRS and conducted with the support of Celgene.

List of ANRS 154 LENAKAP Trial investigators

Dr P. CHEVOJON, Pr C. LEBBE, Dr P. GENET, Dr G. PICHANCOURT, Dr A. LAFEUILLADE, Dr P. DE TRUCHIS, Dr L. ESCAUT, Pr D. SALMON-CERON, Dr E. MORTIER, Pr JM. MOLINA, Dr JM. CHENNEBAULT, Pr P. MORLAT, Pr P. YENI, Dr C. ALLARD, Pr F. RAFFI, Dr E. LAZARO, Pr MICHELET, Dr M. PARTISANI, Pr L. BERNARD, Dr M. OBADIA, Pr T. MAY, Dr L. COTTE, Dr L. BLUM, Dr E. ASLANGUL

REFERENCES

1. Hleyhel M, Belot A, Bouvier AM, et al: Risk of AIDS-defining cancers among HIV-1-infected patients in France between 1992 and 2009: results from the FHDH-ANRS CO4 cohort. Clin Infect Dis 57:1638-47, 2013
2. Martellotta F, Berretta M, Vaccher E, et al: AIDS-related Kaposi's sarcoma: state of the art and therapeutic strategies. Curr HIV Res 7:634-8, 2009
3. Eltom MA, Jemal A, Mbulaiteye SM, et al: Trends in Kaposi's sarcoma and non-Hodgkin's lymphoma incidence in the United States from 1973 through 1998. J Natl Cancer Inst 94:1204-10, 2002
4. Shiels MS, Pfeiffer RM, Hall HI, et al: Proportions of Kaposi sarcoma, selected non-Hodgkin lymphomas, and cervical cancer in the United States occurring in persons with AIDS, 1980-2007. JAMA 305:1450-9, 2011
5. Chang Y, Cesarman E, Pessin MS, et al: Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. Science 266:1865-9., 1994
6. Dittmer DP, Damania B: Kaposi sarcoma associated herpesvirus pathogenesis (KSHV)--an update. Curr Opin Virol 3:238-44, 2013
7. Cattelan AM, Trevenzoli M, Aversa SM: Recent advances in the treatment of AIDS-related Kaposi's sarcoma. Am J Clin Dermatol 3:451-62, 2002
8. Hengge UR, Ruzicka T, Tyring SK, et al: Update on Kaposi's sarcoma and other HHV8 associated diseases. Part 1: epidemiology, environmental predispositions, clinical manifestations, and therapy. Lancet Infect Dis 2:281-92, 2002
9. Nasti G, Martellotta F, Berretta M, et al: Impact of highly active antiretroviral therapy on the presenting features and outcome of patients with acquired immunodeficiency syndrome-related Kaposi sarcoma. Cancer 98:2440-6, 2003
10. Martin-Carbonero L, Barrios A, Saballs P, et al: Pegylated liposomal doxorubicin plus highly active antiretroviral therapy versus highly active antiretroviral therapy alone in HIV patients with Kaposi's sarcoma. Aids 18:1737-40, 2004
11. Northfelt DW, Dezube BJ, Thommes JA, et al: Pegylated-liposomal doxorubicin versus doxorubicin, bleomycin, and vincristine in the treatment of AIDS-related Kaposi's sarcoma: results of a randomized phase III clinical trial. J Clin Oncol 16:2445-51., 1998
12. Stewart S, Jablonowski H, Goebel FD, et al: Randomized comparative trial of pegylated liposomal doxorubicin versus bleomycin and vincristine in the treatment of AIDS-related Kaposi's sarcoma. International Pegylated Liposomal Doxorubicin Study Group. J Clin Oncol 16:683-91, 1998
13. La Ferla L, Pinzone MR, Nunnari G, et al: Kaposi' s sarcoma in HIV-positive patients: the state of art in the HAART-era. Eur Rev Med Pharmacol Sci 17:2354-65, 2013
14. Fife K, Howard MR, Gracie F, et al: Activity of thalidomide in AIDS-related Kaposi's sarcoma and correlation with HHV8 titre. Int J STD AIDS 9:751-5, 1998
15. Krown SE: Management of Kaposi sarcoma: the role of interferon and thalidomide. Curr Opin Oncol 13:374-81., 2001
16. Little RF, Wyvill KM, Pluda JM, et al: Activity of thalidomide in AIDS-related Kaposi's sarcoma. J Clin Oncol 18:2593-602, 2000
17. Soler RA, Howard M, Brink NS, et al: Regression of AIDS-related Kaposi's sarcoma during therapy with thalidomide. Clin Infect Dis 23:501-3; discussion 504-5, 1996
18. Rubegni P, Sbano P, De Aloe G, et al: Thalidomide in the treatment of Kaposi's sarcoma. Dermatology 215:240-4, 2007
19. Kumar S, Rajkumar SV: Thalidomide and lenalidomide in the treatment of multiple myeloma. Eur J Cancer 42:1612-22, 2006

20. Chang X, Zhu Y, Shi C, et al: Mechanism of immunomodulatory drugs' action in the treatment of multiple myeloma. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) 46:240-53, 2014
21. Chen N, Kasserra C, Reyes J, et al: Single-dose pharmacokinetics of lenalidomide in healthy volunteers: dose proportionality, food effect, and racial sensitivity. Cancer Chemother Pharmacol 70:717-25, 2012
22. Chen N, Wen L, Lau H, et al: Pharmacokinetics, metabolism and excretion of [(14)C]-lenalidomide following oral administration in healthy male subjects. Cancer Chemother Pharmacol 69:789-97, 2012
23. Martiniani R, Di Loreto V, Di Sano C, et al: Biological activity of lenalidomide and its underlying therapeutic effects in multiple myeloma. Adv Hematol 2012:842945, 2012
24. Bartlett JB, Tozer A, Stirling D, et al: Recent clinical studies of the immunomodulatory drug (IMiD) lenalidomide. Br J Cancer 93:613-9, 2005
25. Crane E, List A: Lenalidomide: an immunomodulatory drug. Future Oncol 1:575-83, 2005
26. Corral LG, Haslett PA, Muller GW, et al: Differential cytokine modulation and T cell activation by two distinct classes of thalidomide analogues that are potent inhibitors of TNF-alpha. J Immunol 163:380-6, 1999
27. Corral LG, Kaplan G: Immunomodulation by thalidomide and thalidomide analogues. Ann Rheum Dis 58 Suppl 1:I107-13, 1999
28. Dredge K, Marriott JB, Macdonald CD, et al: Novel thalidomide analogues display anti-angiogenic activity independently of immunomodulatory effects. Br J Cancer 87:1166-72, 2002
29. Davies F, Baz R: Lenalidomide mode of action: linking bench and clinical findings. Blood Rev 24 Suppl 1:S13-9, 2010
30. Martinez V, Tateo M, Castilla MA, et al: Lenalidomide in treating AIDS-related Kaposi's sarcoma. Aids 25:878-80, 2011
31. Steff M, Joly V, Di Lucca J, et al: Clinical activity of lenalidomide in visceral human immunodeficiency virus-related Kaposi sarcoma. JAMA Dermatol 149:1319-22, 2013
32. Antar A, El Hajj H, Jabbour M, et al: Primary effusion lymphoma in an elderly patient effectively treated by lenalidomide: case report and review of literature. Blood Cancer J 4:e190, 2014
33. Krown SE, Testa MA, Huang J: AIDS-related Kaposi's sarcoma: prospective validation of the AIDS Clinical Trials Group staging classification. AIDS Clinical Trials Group Oncology Committee. J Clin Oncol 15:3085-92, 1997
34. Lallemand F, Desire N, Rozenbaum W, et al: Quantitative analysis of human herpesvirus 8 viral load using a real-time PCR assay. J Clin Microbiol 38:1404-8, 2000
35. Jung BH, Rezk NL, Bridges AS, et al: Simultaneous determination of 17 antiretroviral drugs in human plasma for quantitative analysis with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Biomed Chromatogr 21:1095-104, 2007
36. Liu Q, Farley KL, Johnson AJ, et al: Development and Validation of a Highly Sensitive Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Method for Simultaneous Quantification of Lenalidomide and Flavopiridol in Human Plasma. Ther Drug Monit, 30:620-7, 2008
37. Prise en charge médicale des personnes vivant avec le VIH : actualisation 2014 du rapport Morlat 2013, 2014
38. Banon S, Machuca I, Araujo S, et al: Efficacy, safety, and lack of interactions with the use of raltegravir in HIV-infected patients undergoing antineoplastic chemotherapy. J Int AIDS Soc 17:19590, 2014

39. Poizot-Martin I, Solas C, Allemand J, et al: Renal impairment in patients receiving a tenofovir-cART regimen: impact of tenofovir trough concentration. J Acquir Immune Defic Syndr 62:375-80, 2013.
40. Nasti G, Talamini R, Antinori A, et al: AIDS-related Kaposi's Sarcoma: evaluation of potential new prognostic factors and assessment of the AIDS Clinical Trial Group Staging System in the Haart Era--the Italian Cooperative Group on AIDS and Tumors and the Italian Cohort of Patients Naive From Antiretrovirals. J Clin Oncol 21:2876-82, 2003
41. Stebbing J, Sanitt A, Nelson M, et al: A prognostic index for AIDS-associated Kaposi's sarcoma in the era of highly active antiretroviral therapy. Lancet 367:1495-502, 2006
42. Robinson A, Kardos M, Kimball AB: Physician Global Assessment (PGA) and Psoriasis Area and Severity Index (PASI): why do both? A systematic analysis of randomized controlled trials of biologic agents for moderate to severe plaque psoriasis. J Am Acad Dermatol 66:369-75, 2012
43. Morooka M, Ito K, Kubota K, et al: Whole-body 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography images before and after chemotherapy for Kaposi sarcoma and highly active antiretrovirus therapy. Jpn J Radiol 28:759-62, 2010
44. Reuter S, Vrachimis A, Huss S, et al: A challenging case of rapid progressive Kaposi sarcoma after renal transplantation: diagnostics by FDG PET/CT. Medicine (Baltimore) 93:e67, 2014
45. Mankia SK, Miller RF, Edwards SG, et al: The response of HIV-associated lymphadenopathic Kaposi sarcoma to highly active antiretroviral therapy evaluated by 18F-FDG PET/CT. Clin Nucl Med 37:692-3, 2012
46. Semeraro M, Vacchelli E, Eggermont A, et al: Trial Watch: Lenalidomide-based immunochemotherapy. Oncoimmunology 2:e26494, 2013
47. Mintzer DM, Real FX, Jovino L, et al: Treatment of Kaposi's sarcoma and thrombocytopenia with vincristine in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. Ann Intern Med 102:200-2, 1985
48. Lassoued K, Clauvel JP, Katlama C, et al: Treatment of the acquired immune deficiency syndrome-related Kaposi's sarcoma with bleomycin as a single agent. Cancer 66:1869-72, 1990
49. Stewart S, Jablonowski H, Goebel FD, et al: Randomized comparative trial of pegylated liposomal doxorubicin versus bleomycin and vincristine in the treatment of AIDS-related Kaposi's sarcoma. International Pegylated Liposomal Doxorubicin Study Group. J Clin Oncol 16:683-91, 1998
50. Uldrick TS, Wyvill KM, Kumar P, et al: Phase II study of bevacizumab in patients with HIV-associated Kaposi's sarcoma receiving antiretroviral therapy. J Clin Oncol 30:1476-83, 2012
51. Dezube BJ, Krown SE, Lee JY, et al: Randomized phase II trial of matrix metalloproteinase inhibitor COL-3 in AIDS-related Kaposi's sarcoma: an AIDS Malignancy Consortium Study. J Clin Oncol 24:1389-94, 2006
52. Koon HB, Krown SE, Lee JY, et al: Phase II trial of imatinib in AIDS-associated Kaposi's sarcoma: AIDS Malignancy Consortium Protocol 042. J Clin Oncol 32:402-8, 2014
53. Banna GL, Collova E, Gebbia V, et al: Anticancer oral therapy: emerging related issues. Cancer Treat Rev 36:595-605, 2010
54. Weingart SN, Brown E, Bach PB, et al: NCCN Task Force Report: Oral chemotherapy. J Natl Compr Canc Netw 6 Suppl 3:S1-14, 2008
55. O'Neill VJ, Twelves CJ: Oral cancer treatment: developments in chemotherapy and beyond. Br J Cancer 87:933-7, 2002
56. Antoniou T, Tseng AL: Interactions between antiretrovirals and antineoplastic drug therapy. Clin Pharmacokinet 44:111-45, 2005

57. Chen N, Weiss D, Reyes J, et al: No clinically significant drug interactions between lenalidomide and Pglycoprotein substrates and inhibitors: results from controlled phase I studies in healthy volunteers. Cancer Chemother Pharmacol 73:1031-9, 2014
58. Tong Z, Yerramilli U, Surapaneni S, et al: The interactions of lenalidomide with human uptake and efflux transporters and UDP-glucuronosyltransferase 1A1: lack of potential for drug-drug interactions. Cancer Chemother Pharmacol 73:869-74, 2014
59. Chen N, Kasserra C, Kumar G, et al: Evidence does not support clinically significant lenalidomide-CCI-779 interaction via P-glycoprotein. J Clin Oncol 30:340-1; author reply 341-2, 2012
60. Flepisi BT, Bouic P, Sissolak G, et al: Drug-drug interactions in HIV positive cancer patients. Biomed Pharmacother 68:665-77, 2014
61. Sgadari C, Bacigalupo I, Barillari G, et al: Pharmacological management of Kaposi's sarcoma. Expert Opin Pharmacother 12:1669-90, 2011
62. La Ferla L, Pinzone MR, Nunnari G, et al: Kaposi' s sarcoma in HIV-positive patients: the state of art in the HAART-era. Eur Rev Med Pharmacol Sci 17:2354-65, 2013
63. Bartlett JB, Michael A, Clarke IA, et al: Phase I study to determine the safety, tolerability and immunostimulatory activity of thalidomide analogue CC-5013 in patients with metastatic malignant melanoma and other advanced cancers. Br J Cancer 90:955-61, 2004
64. Kotla V, Goel S, Nischal S, et al: Mechanism of action of lenalidomide in hematological malignancies. J Hematol Oncol 2:36, 2009
65. Polizzotto MN, Uldrick TS, Wang V, Aleman K, Wyvill KM, Marshall V, Pittaluga S, O'Mahony D, Whitby D, Tosato G, Steinberg SM, Little RF, Yarchoan R: Human and viral interleukin-6 and other cytokines in Kaposi sarcoma herpesvirus-associated multicentric Castleman disease. Blood 122:4189-98, 2013.
66. Chanan-Khan AA, Swaika A, Paulus A, et al: Pomalidomide: the new immunomodulatory agent for the treatment of multiple myeloma. Blood Cancer J 3:e143, 2013
67. Polizotto MN, Uldrick TS, Wyvill KM, Aleman K, Bevans M, Peer C, Figg D, Steinberg S, Zeldis JB, Yarchoan R. Conference of Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI) , Seattle, Washington, USA, february 23-26, 2015, abstract 87.

SUPPLEMENTAL DATA

Physical Global Assessment (PGA) score adapted for Kaposi's sarcoma

Cotation	Description
0 : "completely clear"	100% improvement
1 : "almost clear"	Few residual lesions with improvement ≥90-<100%
2 : "marked improvement"	Residual lesions but significant improvement ≥75-<90%
3 :"moderate improvement"	Intermediate between ≥50-<75%
4 : "slight improvement"	Improvement ≥25-50% but persistance of Kaposi's sarcoma
5 : "no change"	No modification from baseline (±25%)
6 : "worse"	Progression (≥25%)

ACTG criteria

ACTG criteria allow to define four outcomes: complete response (no lesions for at least 4 weeks), partial response (a decrease of at least 50% in the number and size of the lesions for at least 4 weeks, with no new lesions), progression (increase of at least 25% in the number and size of the lesions and/or appearance of a new lesion) and stable disease (all other situations).

Biological outcomes

Changes in biological parameters between baseline and W48 are described in table 4.

Table 4: Changes in biological parameters from baseline to week 48, median (range).

	D0 N=9	**Δ (W48-D0) N=9**	**p-value**
CD4 count, cells/mm^3	485 (151–1471)	-51 (-654–251)	0.678
CD8 count, cells/mm^3	1033 (408–1299)	-185 (-430–531)	0.515
CD4/CD8 ratio	0.62 (0.24–1.13)	0.04 (-0.19–0.43)	0.953
Hemoglobin, g/dL	14.0 (11–14.8)	0.10 (-1.3–1.9)	0.677
Creatinine clearance (MDRD), mL/min	109.8 (81–133.5)	5.7 (-12.7–10.4)	0.612
Platelets, 10^3/mm^3	215 (158–325)	-33 (-91–46)	0.139
Leukocytes, 10^3/mm^3	8.17 (4.52–13.8)	-2.69 (-8– 0)	**0.012**
Neutrophils, 10^3/mm^3	4.34 (2.1–10.23)	-2.04 (-7.74– 0.96)	**0.021**

Cytokine assays

Table 5: Changes in cytokine levels and relation to clinical outcome.

	Baseline (pg/mL) (n=10)		**Change from baseline to last value (pg/mL) (n=10)**			**Patients without progression (n=7)**		**Patients with progression (n=3, #2/10/11)**		
Cytokines	Median	Range	Median	Range	p*	Median	Range	Median	Range	p**
IFN-γ	6.48	1.57 ; 14.07	-0.9	-7.31 ; 129.37	0.799	-1.56	-7.31 ; 2.18	+37.03	4.27 ; 129.37	**0.017**
TNF-α	1.56	1.16 ; 3.71	0.06	-1.50 ; 3.28	0.508	-0.02	-1.50 ; 0.98	+0.31	0.22 ; 3.28	0.067
IL-1b	0.11	0.05 ; 0.16	-0.04	-0.08 ; 0.08	0.169	-0.06	-0.08 ; 0.08	-0.01	-0.04 ; 0.03	0.383
IL-4	0.07	0.01 ; 0.21	-0.01	-0.17 ; 0.06	0.386	-0.01	-0.17 ; 0.06	+0.00	-0.03 ; 0.03	0.517
IL-6	0.82	0.35 ; 1.89	0.16	-1.36 ; 2.03	0.333	+0.14	-1.36 ; 2.03	+0.55	-0.11 ; 1.32	0.383
IL-8	2.86	1.03 ; 6.69	0.90	-1.43 ; 9.31	**0.028**	+0.61	-1.43 ; 8.36	+1.58	0.62 ; 9.31	0.267
IL-10	0.53	0.15 ; 11.65	-0.03	-1.20 ; 298.39	0.721	-0.07	-1.20 ; 0.06	+19.57	0.01 ; 298.39	**0.033**
IL-12p70	0.10	0.05 ; 0.43	0.00	-0.25 ; 0.14	0.600	+0.00	-0.25 ; 0.12	+0.11	-0.07 ; 0.14	0.517
IL-17A	0.96	0.37 ; 2.01	-0.21	-1.64 ; 1.57	0.594	+0.00	-1.64 ; 0.64	-0.43	-0.73 ; 1.57	0.833
VEGF-A	36.51	13.49 ; 147.61	-4.17	-33.07 ; 0.31	0.169	-3.92	-106.66 ; 26.58	-8.34	-22.24 ; 11.05	1.000

Abbreviations: IFN, interferon; IL, interleukin; IQR, interquartile range; TNF, tumor necrosis factor, VEGF, vascular endothelial growth factor

* Nonparametric analysis of change in cytokine levels (Baseline - Last value), Wilcoxon signed rank test.

** Nonparametric analysis, Mann-Whitney test

C. **Résultats et conclusion**

Dans cet article, que je signe en deuxième auteur, nous avons décrit la réponse au traitement par lénalidomide de 12 hommes, répondant aux critères d'inclusion de l'essai clinique ANRS 154 Lenakap, recrutés dans 9 hôpitaux français, entre novembre 2011 et février 2013. Ces derniers, étaient âgés de 48 ans (30-68) en médiane, d'origine caucasienne pour 9 d'entre eux et sub-saharienne pour les 3 derniers. Neuf étaient des HSH et 3 hétérosexuels, infectés par le VIH depuis 14,3 ans (2,2-24,8), traités par ARV depuis 11,5 ans (2,1-17). A l'inclusion, ils présentaient tous une CV VIH indétectable et un taux de CD4 médian de 444/mm^3 (151-1471). Leur nadir de CD4 était de 197/mm^3 (13-488) et leur zénith de CV VIH de 5 Log_{10} copies/ml (3-5,8). Leurs combinaisons ARV contenaient 2 INTI et un IP/r pour 7 d'entre eux, 2 INTI et 1 INNTI pour 2 d'entre eux et 1 INI associé à 1 IP/r et/ou 2 INTI et/ou 1 INNTI pour les 3 derniers. Ils présentaient en médiane 21 lésions de MK (7-99) et avaient reçu 6 lignes antérieures de chimiothérapie cytotoxique (1-13) en médiane, avec 11,3 cycles (4,5-12) par patients. Seuls 2 patients présentaient une CV HHV-8 positive à l'inclusion.

L'analyse de l'efficacité du traitement a porté sur 10 patients évaluables à S24. Un patient est sorti de l'étude à J7, pour hypersensibilité au lénalidomide (exanthème) et un second à J13, pour insuffisance rénale aiguë, dans un contexte d'insuffisance rénale chronique. Ce patient présentait à l'inclusion un surdosage en ténofovir (concentration résiduelle de 305 ng/ml). Parmi les 10 patients évaluables, l'un d'entre eux a bénéficié d'une réduction de dose à 15mg/j de lénalidomide au cours du premier cycle et ce jusqu'à S48, en raison d'un exanthème. Trois patients ont présenté une progression de la MK, respectivement à S16, S24 et S28, à la fois selon le score PGA et ACTG. Ces 3 patients ont présenté une CV HHV-8 positive au cours de l'étude. L'un d'entre eux a, développé au cours de l'étude une maladie de Castleman. Chez ce dernier patient, un problème d'observance a été suspecté, en raison d'une consommation des gélules inférieure à 90%, mais aussi d'un rebond de la CV VIH à S4 et de concentrations plasmatiques résiduelles d'ARV indétectables à S12. Selon le score PGA, les 7 autres patients évaluables sont restés stables à S24 et S48, sans qu'aucune réponse partielle ou totale ne soit rapportée. En revanche, selon le score ACTG, un patient à S24 et 4 à S48, ont présenté une réponse partielle au lénalidomide, avec une diminution de la surface totale de leurs lésions index comprise entre -51 et -82%. Nos analyses ont également rapporté une survie sans progression des patients de 63,6% (35,4-84,8), avec une médiane de plus de 12 mois sans progression et un taux de survie de 90,9%.

Les analyses biologiques et le suivi clinique des patients ont permis de mettre en évidence une très bonne tolérance du traitement. En effet, il n'a pas été observé de modification des taux moyens de lymphocytes CD4, CD8, du ratio CD4/CD8, des taux d'hémoglobine, de plaquettes ou encore des clairances de la créatinine. Néanmoins, une diminution des taux de leucocytes et de polynucléaires neutrophiles a été enregistrée. Par ailleurs au cours des 101 cycles de cet essai clinique, seuls 14 effets indésirables de grade 3 ou 4 au moins possiblement liés au lénalidomide, soit 1 pour 12 cycles, ont été rapportés. Ces effets indésirables ont concerné 7 patients et étaient majoritairement liés à la myélotoxicité du produit avec des neutropénies (n=4), thrombopénies (n=3) et anémie (n=1).

L'analyse multiplex nous a permis de décrire l'évolution des taux plasmatiques de chimiokines, cytokines et facteurs de croissance plasmatiques chez les patients, tout au long du suivi. Parmi les facteurs étudiés, seuls les taux d'IL-8 ont augmenté, après mise sous lénalidomide, tandis que les autres paramètres sont restés stables. Aucun taux à l'inclusion de ces facteurs ne s'est avéré prédictif de l'évolution des patients. Cependant, nous avons observé que les patients présentant une diminution des taux d'IFN-γ et de TNF-α au cours du traitement, présentaient également une diminution de la surface de leurs lésions index, suggérant l'implication de ces médiateurs dans le maintien des lésions. Enfin, les patients ayant progressé au cours de l'étude ont présenté une augmentation des taux d'IL-10 et d'IFN-γ, statistiquement supérieure à celle des patients stables, suggérant le rôle de ces protéines dans la progression de la maladie.

Les concentrations plasmatiques d'ARV mesurées par UPLC-MS/MS au cours de l'étude pharmacologique, correspondaient, pour la plupart, à celles recommandées dans la prise en charge des patients infectés par le VIH. Trois cas de dosages inappropriés ont cependant été mis en évidence. Nous avons tout d'abord détecté un surdosage en ténofovir, chez le patient insuffisant rénal, sorti d'étude à J13. Ce dernier n'avait pas bénéficié d'adaptation de dose de cette molécule, connue comme pouvant être associée à des tubulopathies concentrations-dépendantes. Ceci a possiblement précipité le déclin de sa fonction rénale. Un second patient a présenté une indétectabilité des traitements ARV à S12. Ces résultats semblaient liés à un problème d'observance, comme suggéré par le nombre de gélules consommées inférieur à 90% à S24 et son rebond de CV VIH à S12. Ce patient a présenté une maladie de Castleman et est sorti de l'essai à S28. Enfin, chez un dernier patient nous avons retrouvé des concentrations plasmatiques de darunavir faibles à S12, S24 et S48, tandis que les autres ARV étaient correctement dosés. Ce sous-dosage était probablement lié à

un problème d'absorption intestinale, possiblement à l'origine du rebond de la CV VIH à S48 (73 copies/ml), sans que ne progresse la MK-VIH. Parallèlement, nous avons mesuré les concentrations plasmatiques de lénalidomide. Aucune accumulation de cette molécule n'a été observée, y compris chez les patients recevant des inhibiteurs des Pgp, tels que le ritonavir, suggérant une absence d'interaction entre le lénalidomide et les ARV.

En conclusion, malgré une interprétation difficile de la réponse au traitement des patients au cours de cette étude, notamment en raison de discordances entre les scores PGA, ACTG et entre les groupes d'évaluateurs, nous avons rapporté une bonne tolérance du lénalidomide chez les patients infectés par le VIH, traités par ARV. Ces derniers ont par ailleurs montré des taux de survie sans progression élevés et prolongés. Nous avons également mis en évidence l'impact du TNF-α, de l'IFN-γ et de l'IL-10 dans l'évolution de la MK-VIH. Enfin, aucune interaction médicamenteuse pharmacologiquement ou cliniquement significative n'a été détectée chez nos patients, ouvrant de nouvelles perspectives pour la prise en charge de ces derniers, y compris dans d'autres indications, tels que le myélome multiple et les syndromes myélodysplasiques.

2) Le trio CXCL12/CXCR4-CXCR7 : biomarqueur de la maladie de Kaposi liée au VIH ?

A. Rationnel

La maladie de Kaposi est un exemple représentatif de tumeur opportuniste. En effet, les lésions de MK régressent le plus souvent, en cas de restauration de l'immunité, comme cela est rapporté dans les formes liées au VIH ou iatrogène (68, 125).

Comme nous l'avons vu précédemment, les lésions cutanées, brunes ou bleutées et multifocales, évoluent typiquement d'un stade maculaire, peu avancé, présentant une prolifération dermique de fentes vasculaires, accompagnées d'une extravasation de globules rouges et d'un discret infiltrat lympho-plasmocytaire, à un stade papulaire, plus avancé, affichant une prolifération modérée de SC et un infiltrat inflammatoire plus abondant, puis enfin, à un stade nodulaire, dit tumoral, envahi par un vaste réseau de fentes et de SC (2). Typiquement, les lésions de MK présentent un nombre de cellules en prolifération, exprimant la protéine de latence LANA et des facteurs pro-angiogéniques progressant avec le stade des lésions (537-541).

L'ensemble des mécanismes physiopathologiques de la MK n'est pas encore élucidé et nous ne disposons actuellement d'aucun biomarqueur, de suivi d'évolution, ou de réponse au traitement. La chimiokine CXCL12, constitutivement exprimée par un grand nombre de tissus humains, est capable, après fixation à ces 2 RCPG, CXCR4 et CXCR7, d'induire l'activation de différentes voies de signalisation impliquant la PI3K, AKT, les MAPK et les β-arrestines, connues pour participer à la croissance, la progression tumorale, l'angiogenèse et le développement de métastases (214, 295). Dans la MK, les données de la littérature, principalement obtenues *in vitro,* suggèrent l'implication du trio CXCL12/CXCR4-CXCR7 dans la physiopathologie (103, 104, 182, 254, 255, 284, 285, 304). Cependant les limites de ces études, tels que le faible nombre d'échantillons, le manque de données épidémiologiques relatives aux patients, les résultats contradictoires publiés et l'absence d'analyse simultanée des trois protagonistes rendent nécessaire l'évaluation *in vivo* et de façon prospective, de l'implication du trio dans cette pathologie. Par ailleurs, l'hypothèse selon laquelle le trio pourrait être un biomarqueur de la pathologie demande à être étayée.

Le but de notre travail a été d'étudier par immunohistochimie, le profil de détection protéique de CXCL12, CXCR4 et CXCR7, au sein de lésions cutanées de MK-VIH. Nous

avons bénéficié de l'accès aux prélèvements cutanés de la collection d'échantillons constituée dans le cadre de l'essai clinique ARNS 154 Lenakap et à ceux de groupes contrôles atteints de MK-classique ou d'angiome (collaborations Pr N. Dupin et Dr A. Carlotti). Après avoir effectué les marquages immunohistochimiques, la quantification du pourcentage de cellules cibles (cellules endothéliales et/ou SC) marquées par nos protéines d'intérêt au sein des BC, a été effectuée à l'aide d'une technique semi-automatisée, mise au point par notre équipe, à partir du logiciel Visilog®. Le profil de détection du trio a été comparé à ceux de marqueurs associés à la physiopathologie de la MK : LANA, Ki67 et VEGF, à l'aide de co-marquages en immunofluorescence et par des analyses de corrélation entre les taux de détection. Pour la première fois dans la MK, nous avons analysé par méthodes ELISA et multiplex un grand nombre de facteurs solubles incluant CXCL12, l'IFN-γ, le TNF-α, le VEGF-A, l'IL-1β, l'IL-4, l'IL-6, l'IL-8, l'IL-10, l'IL-12p70 et l'IL-17A, afin d'identifier un biomarqueur plasmatique de la MK, primordial au suivi et à une prise en charge plus faciles des patients. Pour cette analyse, nous avons eu accès aux prélèvements plasmatiques des patients de l'essai clinique ANRS 154 Lenakap, avant mise sous lénalidomide et à l'arrêt du traitement, ainsi qu'à ceux de volontaires sains (collaboration Etablissement Français du Sang) et de patients VIH sans MK (collaboration Dr C. Deback).

B. **Article 2 : Exposé des travaux**

The CXCL12/CXCR4-CXCR7 pathway, a biomarker for Kaposi's sarcoma skin lesions: an ANRS 154 LENAKAP sub-study

Aude Desnoyer, Nicolas Dupin, Lambert Assoumou, Agnès Carlotti, Françoise Gaudin, Claire Deback, Gilles Peytavin, Anne-Geneviève Marcelin, François Boué, Karl Balabanian*, Valérie Martinez-Pourcher*

*KB et VM-P ont contribué de manière équivalente à ce travail

Manuscrit en cours de soumission pour publication dans *Journal of Investigative Dermatology*

The CXCL12/CXCR4-CXCR7 pathway, a biomarker for Kaposi's sarcoma skin lesions: an ANRS 154 LENAKAP sub-study

Author full names, departments and institutions:

Aude Desnoyer[1, 2], Nicolas Dupin[3], Lambert Assoumou[4], Agnès Carlotti[5], Françoise Gaudin[2], Claire Deback[2,6], Gilles Peytavin[1], Anne-Geneviève Marcelin[4,8], François Boué[7], Karl Balabanian[2,*], Valérie Martinez-Pourcher[2, 8,*]

[1] Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Bichat-Claude Bernard, Département de Pharmaco-toxicologie clinique, Paris, F-75018 France

[2] Univ. Paris-Sud, Laboratory "Cytokines, Chemokines and Immunopathology", UMR_S996, INSERM, Laboratory of Excellence in Research on Medication and Innovative Therapeutics, Clamart, F-92140 France.

[3] Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Groupe Hospitalier Cochin, Service de Dermatologie, Paris, F-75006, France and Institut Cochin, Inserm U1016, Université Paris Descartes, Paris, F-75006, France.

[4] Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR_S 1136, Institut Pierre Louis d'Epidémiologie et de Santé Publique, Paris, F-75006, France

[5] Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Groupe Hospitalier Cochin, Service d'Anatomopathologie, Paris, F-75006, France

[6] Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Paul Brousse, Service de Virologie, Villejuif, F-94800, France

[8] Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Laboratoire de Virologie, Paris, F-75013, France

[7] Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Antoine Béclère, Service de Médecine Interne, Clamart, F-92140, France

[8] Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Service de Maladies Infectieuses et Tropicales, Paris, F-75013, France, France Sorbonne Universités, UPMC, Univ Paris 06,

City, state and country in which the work was done:

UMR-S 996, INSERM/ Université Paris-Sud, 32 rue des Carnets 92140 Clamart, France

Co-Corresponding author: * Contributed equally to the work

Valérie Martinez-Pourcher,

Address: 45-83, Bd de l'Hôpital, 75013 Paris, France

Phone: +33 6 38 26 67 77

Fax: +33 1 42 16 01 24

Email : valerie.martinez@aphp.fr

Karl Balabanian

32 rue des Carnets, 92140 Clamart, France

+33 1 41 28 80 03

+33 1 46 32 79 93

karl.balabanian@u-psud.fr

Short running head (≤45 characters): **The CXCL12/CXCR4-CXCR7 trio in Kaposi sarcoma**

Abbreviations used:

AIDS-KS, HIV-associated Kaposi's sarcoma; classic-KS, Kaposi's sarcoma classic form; HIV non-KS, HIV-infected patients without Kaposi's sarcoma; HHV-8, Human Herpesvirus-8; HIV, human immunodeficiency virus; IF, immunofluorescence; IFN, Interferon; IHC, immunohistochemistry; IL-, interleukine; Ki67, proliferation rate; KS, Kaposi's sarcoma; LANA, latency-associated nuclear antigen; MAPK, mitogen activated protein kinase; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; TNF, Tumor Necrosis Factor; VEGF, vascular endothelial growth factor; X^+, positive cells

Abstract:

An open label, multicenter, phase II trial (ANRS 154 Lenakap) was conducted to evaluate the efficacy and safety of lenalidomide in HIV-controlled patients with progressive Kaposi's sarcoma (KS) despite previous treatment by specific chemotherapy. We aimed at investigating if the chemokine CXCL12, and its receptors CXCR4 and CXCR7, could serve as KS biomarkers. CXCL12/CXCR4-CXCR7, HHV-8 latency-associated nuclear antigen (LANA), proliferation rate (Ki67) and vascular endothelial growth factor (VEGF) were quantified in cutaneous biopsies from Lenakap's patients, KS classic form or angiomas using immunohistochemistry and quantitative image analysis. All markers were significantly increased in AIDS-KS and classic-KS *versus* angiomas as well as in nodular *versus* macular or papular KS-lesions. CXCL12 and its receptors expressions positively correlate with Ki67, VEGF and LANA. At the systemic level, CXCL12 plasma concentrations in AIDS-KS did not differ from those observed in healthy donors or in HIV-positive non-KS patients. In contrast, levels of IL-6 and IL-10, and to a lesser extent of TNF-α and IFN-γ, were increased in AIDS-KS. These findings highlight an up-regulation of the CXCL12/CXCR4-CXCR7 trio in KS that correlates with severity of and viral expression in cutaneous lesions. Histologic assessment of the CXCL12 axis could serve as a valuable biomarker for KS diagnosis and progression.

Introduction:

Kaposi's sarcoma (KS) remains a prevalent neoplasia worldwide and one of the most common tumor in HIV-infected individuals (Hleyhel *et al*., 2013; Rubinstein *et al*., 2014). This neoplasia is a multifactorial disease associating the necessary presence of the Human Herpesvirus-8 (HHV-8), a particular cytokine and growth factor rich microenvironment and a state of immunosuppression (Hengge *et al*., 2002b). KS is the most representative example of an opportunistic tumor as most of KS lesions regress within immune restoration when it is possible such as it was reported in AIDS related KS (AIDS-KS) patients and post-transplant KS patients (Hleyhel *et al*., 2013; Hosseini-Moghaddam *et al*., 2012).

Typically, this mesenchymal tumor appears as multifocal cutaneous purple-reddish macular lesions frequently evolving to papules and/or nodules also considered as tumor-stage (Hengge *et al*., 2002a). Histologically, macules comprised proliferation of small, slit-like dermal vessels, accompanied by a polymorphous cellular infiltrate. At papule-stage, the expansion of dispersed spindle–shaped morphology cells associated with dermal dendritic cells, T- and B-cells infiltrate are observed. Finally, nodular-stage is composed of an extensive network of slit-like spaces lined by a high amount of spindle cells. In KS lesions, most spindle-shaped cells are latently infected and express the latent nuclear antigen (LANA) of HHV-8, while a subset of few cells of a debated lineage may harbor lytic infection, which is probably necessary for KS progression and tumorogenesis (Dupin *et al*., 1999; Grundhoff and Ganem, 2004; Hengge *et al*., 2002a). Commonly, KS lesions displayed a high amount of cells expressing LANA and a high proliferation and angiogenesis rate, rising with lesions severity (De Thier *et al*., 1999; Long *et al*., 2009; Ozen *et al*., 2005; Penin *et al*., 2002; Samaniego *et al*., 1998).

It is known that chemokines play an important role in KS pathogenesis (Hengge *et al*., 2002b). The chemokine CXCL12 is broadly expressed in human body and binds to CXCR4

and CXCR7. These two G protein-coupled receptors can signal through different pathways including phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt, mitogen activated protein kinase (MAPK) or β-arrestin (Duda *et al*., 2011; Hattermann and Mentlein, 2013; Lagane *et al*., 2008). These signaling pathways facilitate tumor growth and confer to the cells a growth advantage that may favor both tumor progression and metastatic development and angiogenesis (Duda *et al*., 2011; Freitas *et al*., 2014). Some recent studies have investigated CXCL12, CXCR4 and CXCR7 in KS and suggest an implication of the three proteins in KS pathophysiology (Duda *et al*., 2011; Freitas *et al*., 2014; Pablos *et al*., 1999; Punj *et al*., 2010; Sun *et al*., 2010; Uccini *et al*., 2003; Wang *et al*., 2004; Yao *et al*., 2003). However, conflicting results have been published and most of them were obtained from *in vitro* study or on a limited number of patients. Moreover, analyses were performed without specifying KS type, lesions stage, patients immunological and treatment features and without evaluating concomitantly the expression of the three members of the trio, in skin lesions and in plasma sampled.

The ANRS 154 Lenakap trial is a single-arm, multicenter, open label, Gehan's two-stage phase II trial sponsored by the French national agency for research on AIDS and viral hepatitis (NCT01282047) (Martinez-Pourcher et al, Phase II trial of lenalidomide in patients with HIV-associated Kaposi's sarcoma receiving antiretroviral therapy: Results of the ANRS 154 Lenakap Trial. *in preparation*), which aims at evaluating the efficacy and safety of lenalidomide in AIDS-KS. Patients had a skin biopsy at enrolment and plasma collection at baseline and monthly during the 48 weeks of follow-up.

In the sub-study presented here, we investigated and quantified by immunohistochemistry (IHC) the *in situ* expression status of CXCL12, CXCR4 and CXCR7 in cutaneous biopsies from patients included in Lenakap trial and compared them to those in patients with KS classic form (classic-KS) and angiomas and further assessed their relationship with lesion type and other markers associated with KS including LANA, Ki67 and VEGF. We also

assessed by ELISA and multiplex assay plasmatic cytokines and growth factors level in AIDS-KS patients and compared them to levels measured in healthy donors and in HIV-infected patients without KS (HIV non-KS).

Results:

The CXCL12/CXCR4-CXCR7 trio is up-regulated in KS lesions

We investigate *in situ* protein expressions of CXCL12, CXCR4 and CXCR7 on KS lesions, obtained at the inclusion of the 12 patients in ANRS 154 Lenakap's clinical trial (16 AIDS-KS cutaneous sections: 7 macules, 7 papules and 2 nodules) and compared to those from 12 patients with classic-KS (21 cutaneous sections: 4 macules, 6 papules and 11 nodules) and from 10 patients with angiomas (20 cutaneous sections). All proteins were clearly detected in the vascular dermis part of skin, but not in the epidermis, neither in the sections stained with corresponding isotype- and species-matched antibodies. CXCL12 immunostaining was detectable in endothelial cells from blood vessels, dendritic cells and lymphocytes from all skin biopsies. The expression was confined to the cytoplasm of healthy and malignant cells, with a strong membrane staining and without nuclear detection. It was intensely positive within spindle cells in AIDS- and classic-KS lesions (Figure 1a-c). Protein quantification revealed that CXCL12 expression was significantly increased in endothelial cells from classic-KS and AIDS-KS in comparison to endothelial cells from angiomas (Figure 1j).

CXCR4 expression was more heterogeneous. It was weakly detectable on dermal fibroblasts and endothelial cells from angiomas and strongly positive on mononuclear, endothelial and spindle cells from classic- and AIDS-KS sections. The expression was confined to cytoplasm in angiomas but was detectable both in cells cytoplasm and nuclei from endothelial and spindle cells in classic- and AIDS-KS (Figure 1d-f). The up regulation of CXCR4 expression in these cells in KS versus angiomas was confirmed by quantification (Figure 1k).

CXCR7 was also heterogeneously detected in endothelial cells of angiomas and KS skin biopsies and clearly detected in spindle cells of KS lesions. This expression was exclusively cytoplasmic without strong membrane or nuclei staining (Figure 1g-i). At a quantitative level, we observed once again a higher expression of CXCR7 in classic- and AIDS-KS in comparison to angiomas (Figure 1l). We did not observe any qualitative and quantitative difference between classic- and AIDS-KS. Thus, these results unveiled an up-regulation of the CXCL12/CXCR4-CXCR7 trio in KS.

Expression of the CXCL12/CXCR4-CXCR7 trio correlates with the severity of KS lesions

As AIDS- and classic-KS have the same histopathology feature, we next compared CXCL12, CXCR4 and CXCR7 expressions in KS endothelial and spindle cells, according to lesion stages (11 macular, 13 papular and 13 nodular histologic lesions). CXCL12 expression ranged from 47.4% (31.9-65.1) of endothelial or spindle cells in macules, to 69.9% (53.3-66.8%) in papules and 78.8% (67.1-85.3%) in nodules (Figure 2a-c). This expression was significantly increased in nodular vs. macular and papular lesions (Figure 2j). Similar results were observed for CXCR4 (59.4% (50.7-63.7%) of endothelial or spindle cells expressing CXCR4 in macules, 63.3% (59.3-67.9%) in papules, and 84.0% (80.4-90.7%) in nodules) and CXCR7 (51.2% of endothelial or spindle cells expressing CXCR7 (40.2-64.8%) in macules, 52.6% (44.7-65.0%) in papules and 81.4% (69.6-86.2%) in nodules (figure 2d-i). The fractions of CXCR4 or CXCR7 positive cells ($CXCR7^{+}$) were increased in nodules vs. macules and papules (Figure 2k, l). Thus, the CXCL12/CXCR4-CXCR7 trio reflects KS histotypes.

Correlation of CXCL12/CXCR4-CXCR7 expressions with indicators of KS activity

We then investigated whether the expression of the CXCL12/CXCR4-CXCR7 trio correlated with indicators known to be involved in KS, *i.e*. LANA, Ki67 and VEGF (De Thier *et al*.,

1999; Long *et al*., 2009; Ozen *et al*., 2005; Penin *et al*., 2002; Samaniego *et al*., 1998). As expected, LANA was not detected in angiomas and was mainly found in nuclei from cells surrounding slit-like vessels and spindle cells from classic- and AIDS-KS (figure 3a-h). The staining was higher in nodular than in macular and papular lesions (figure 3b-g, 3i). Interestingly, most $LANA^+$ cells co-stained with CXCL12, CXCR4 or CXCR7 (figure 3j-l) and the proportions of $CXCL12^+$, $CXCR4^+$ and $CXCR7^+$ endothelial and spindle cells positively correlated with the tissue latent viral load (Figure 3m-o). Ki67 is an antigen associated with nuclear proliferation expressed during the cell growth cycle, clearly detectable in KS cutaneous lesions (De Thier *et al*., 1999; Gerdes *et al*., 1991; Penin *et al*., 2002). Ki67 staining was nuclear and mainly observed in Langherans, endothelial and spindle cells. It was barely observed in angiomas biopsies but was similarly detected in both classic- and AIDS-KS endothelial and spindle cells (Figure 4a-h). Considering KS histologic stages, we observed a higher proliferation fraction in nodular than in macular and papular lesions (Figure 4b-g, 4i). Most of $Ki67^+$ cells were positive for CXCL12, CXCR4 or CXCR7 (figure 4j-l) and in line with this, there were positive correlations between $CXCL12^+$, $CXCR4^+$, $CXCR7^+$, $LANA^+$ endothelial and spindle cells and the proliferation index (Figure 4m-p). Finally, the status of VEGF was assessed, as this growth factor is known to regulate angiogenesis and vascular permeability in KS lesions (Arasteh and Hannah, 2000; Cornali *et al*., 1996; Samaniego *et al*., 1998). VEGF staining was observed in endothelial and spindle cells cytoplasm of KS lesions while it was barely detectable in angiomas (Figure 5a-g). Protein quantification confirmed that VEGF expression was increased in classic- and AIDS-KS and higher in nodular than in macular and papular lesions (Figure 5h-i). Our findings further showed a positive correlation between $CXCR4^+$, $CXCR7^+$, $LANA^+$, $Ki67^+$ endothelial and spindle cells and the VEGF status (Figure 5j-n). Taken together, these data indicate that the expression level of the CXCL12/CXCR4-CXCR7 trio could be a tissue biomarker of KS lesions.

Plasma CXCL12 did not reflect the severity of skin lesions in KS

Plasma chemokine, cytokine and growth factor levels from ANRS 154 Lenakap's patients at baseline were compared to those measured in 13 healthy donors and 12 HIV non-KS patients (8 HHV-8 seronegative and 4 HHV-8 seropositive patients), matched on age and sex for both control groups and on ethnicity, CD4 T-cell count and combined antiretroviral therapy for HIV non-KS group). Plasma levels measured at baseline were also compared to those at lenalidomide endpoint in ANRS 154 Lenakap's patient.

Using an ELISA method, we observed a significant increase in CXCL12 concentrations, in plasma from AIDS-KS patients, between baseline and lenalidomide's endpoint [Δ (Endpoint-Baseline): +421 pg/ml (-345; 810 pg/ml); *P*=0.017]. No difference was reported between patients with non-progressive and progressive KS (Table 1A). Thus, plasma level of CXCL12 is not in itself a valuable prognostic factor in patients with KS.

We also compared the amounts of CXCL12 and other soluble factors in AIDS-KS before lenalidomide treatment to those measured in 13 healthy donors and in 12 HIV non-KS patients. Using a multiplex assay, we did not observe any difference in plasma concentration of CXCL12 as well as in interleukine (IL)-1β, -4, -8, -12p70, -17A and VEGF-A between the three groups (Table 1B). In contrast, levels of IL-6 and IL-10, and to a lesser extent, of Tumor Necrosis Factor (TNF)-α and Interferon (IFN)-γ, tended to be higher in AIDS-KS patients than in HIV non-KS and healthy individuals. Thus, plasma level of CXCL12 is not in itself a valuable prognostic factor in patients with KS.

Discussion:

In the present study, we compared proteins expression from ANRS 154 Lenakap's patients to those observed in classic-KS, a KS clinical variant associated with HHV-8 but not with HIV infection and to those measured in angioma, a benign skin lesion characterized by dermis vascular proliferation without HHV-8 and HIV infections.

As previously published, all proteins were clearly detected in the vascular dermis part of skin, but not in the epidermis, neither in the sections stained with corresponding isotype- and species-matched antibodies, confirming the success of the IHC procedure and the appropriate choice of controls (Pablos *et al*., 1999; Volin *et al*., 1998).

We highlighted a concomitant CXCL12/CXCR4-CXCR7 up-regulation both in AIDS- and classic-KS compared to angiomas. CXCL12 up-regulation in KS was consistent with previous works (Pablos *et al*., 1999; Yao *et al*., 2003) indicating that CXCL12 is constitutively expressed by endothelial and dendritic cells in normal skin and appears to be up regulated in a nodular lesion from AIDS-KS. CXCR4 up-regulation found in our study extended previous results indicating an increased level of *CXCR4* messenger ribonucleic acid in KS cells of six patients' lesions, although histotype and HIV status were not specified (Wang *et al*., 2004), and intense CXCR4 expression on 6 nodular lesions from classic-KS patients (Uccini *et al*., 2003). However, these results differ from other studies describing weak CXCR4 expression in one macular lesion of an AIDS-KS patient (Yao *et al*., 2003) or *CXCR4* down-regulation after infection of human vascular endothelial cells by HHV-8 (Punj *et al*., 2010). Nonetheless, these data were obtained *in vitro* or only on one KS lesion, and was not coherent with the well-documented CXCR4 expression on endothelial cells (Pablos *et al*., 1999; Volin *et al*., 1998). The intriguing CXCR4 nuclear detection observed in KS but not in angiomas biopsies is consistent with previous findings obtained in gastric, prostate, colorectal cancer and renal cell carcinoma (Don-Salu-Hewage *et al*., 2013; Masuda *et al*., 2014; Speetjens *et al*., 2009;

Wang *et al*., 2009) and in agreement with the nuclear localization sequence identified within CXCR4 protein (Don-Salu-Hewage *et al*., 2013; Wang *et al*., 2010). Finally, CXCR7 up-regulation is in accordance with recent works suggesting CXCR7 involvement in virus-related cancers, especially in KS (Freitas *et al*., 2014). Indeed *CXCR7* expression was found to be up regulated in HHV-8 infected dermal microvascular endothelial cells and to be implicated in their proliferation and foci formation (Freitas *et al*., 2014; Raggo *et al*., 2005).

Our study highlights a concomitant up-regulation of CXCL12, CXCR4 and CXCR7 in KS lesions when compared to benign skin lesions, thus extending the role of this axis reported in other chronic skin inflammation (Zgraggen *et al*., 2014). No qualitative and quantitative differences were observed between classic- and AIDS-KS staining, so we compared the trio proteins expressions and KS lesions stage. We showed that the trio correlates with the severity of KS lesions, suggesting an implication of this axis in KS pathophysiology, regardless clinical variant.

Moreover, these deregulations correlated with known KS pathophysiological indicators, making feasible to envision the CXCL12/CXCR4-CXCR7 axis as a tissue type 0 biomarker that measures the natural history of a disease and should correlate over time with known clinical indicators (Heckman-Stoddard, 2012). In fact, the trio correlates with LANA, a major HHV-8 latent protein, displaying a nuclear localization and exhibiting oncogenic properties (Hengge *et al*., 2002b; Long *et al*., 2009). This protein has been shown to increase in KS nodules (Long *et al*., 2009), participate in the tumorigenic process and constitute a KS diagnosis biomarker (Flepisi *et al*., 2014). According to previous works (Yao *et al*., 2003), we detected that LANA and CXCL12 co-stained in KS lesions and this was originally extended to CXCR4 and CXCR7. Combined to the positive correlation between each partner of the trio and LANA in KS lesions, this suggests a tight relationship between HHV-8 and the CXCL12/CXCR4-CXCR7 axis. The Ki67 rates observed in our study were consistent with

those displayed in previous works (ranging from 8% to 20%) (De Thier *et al*., 1999; Ozen *et al*., 2005; Penin *et al*., 2002). Conflicting results have been reported regarding proliferation index according to KS lesions stages (De Thier *et al*., 1999). Hodak and coll. found a correlation between Ki67 reactivity and the histopathological stages and Haupt and coll. reported an increased proliferation in plaques/nodules *vs*. macules (Haupt *et al*., 1995; Hodak *et al*., 1999). In sharp contrast, others did not find any difference in proliferation index among KS stages, although nodular-stages exhibited the higher proliferation fraction but failed to reach significance (De Thier *et al*., 1999; Penin *et al*., 2002). Our findings that proliferation index is highest in nodular lesions and correlates with the CXCL12/CXCR4-CXCR7 trio as well as LANA expression is interesting in regard to the higher percentage of $CXCL12^+$, $CXCR4^+$, $CXCR7^+$ and $LANA^+$ cells in nodular stage and to the reported role of each protein in cell proliferation especially in cancers (Duda *et al*., 2011; Hattermann and Mentlein, 2013; Lin *et al*., 2014; Lu *et al*., 2014). To our knowledge, none study had investigated the VEGF status in KS lesions regarding histologic stage. Here we showed that VEGF expression increases with the progression of lesions and is significantly higher in both forms of KS as compared to angioma. These findings are consistent with the reported role of VEGF as an autocrine/paracrine growth factor for KS cells, its high protein abundance in spindle cells and its cooperation with different cytokines to regulate angiogenesis and vascular permeability in KS (Arasteh and Hannah, 2000; Cornali *et al*., 1996; Samaniego *et al*., 1998). The positive correlations observed between VEGF and CXCR4, CXCR7, LANA or Ki67 were also coherent with previous works. Indeed, VEGF closely correlates with CXCR4 in different types of malignancies including breast cancer and rhabdomyosarcoma (Liang *et al*., 2007; Miyoshi *et al*., 2014), and CXCR7 enhances VEGF expression and secretion, resulting in a positive feedback on its own expression (Lin *et al*., 2014; Zheng *et al*., 2010). Finally, VEGF enhances target cells infection by HHV-8, activates human dermal microvascular endothelial

cells proliferation and is mitogenic for endothelial cells (Cornali *et al*., 1996; Ford *et al*., 2004; Samaniego *et al*., 1998).

As described above, various inflammatory cytokines or growth factors have been proposed as KS diagnosis or prognosis biomarkers (Flepisi *et al*., 2014). Unfortunately, CXCL12 cannot be used as a plasmatic biomarker, easier to use in a day-to-day practice, both as an indicator of the pathogenic process or of the pharmacological response to lenalidomide. Indeed, we observed no differences in CXCL12 plasma levels between AIDS-KS at baseline, healthy donors and HIV non-KS patients (both HHV-8 positive and negative), and between baseline and treatment's endpoint in ANRS 154 Lenakap trial progressive and non-progressive patients. Intriguingly, we observed an increase of CXCL12 plasma level between lenalidomide's endpoint and baseline, regardless the progression profile. This finding is somewhat puzzling, but may be interpreted in light with the absence of complete response in the study, patients displaying only stable or progressive disease (Martinez-Pourcher et al, Phase II trial of lenalidomide in patients with HIV-associated Kaposi's sarcoma receiving antiretroviral therapy: Results of the ANRS 154 Lenakap Trial. *in preparation*).

In contrast, plasma levels of IL-6 and IL-10, and to a lesser extent, of TNF-α and IFN-γ, were higher in AIDS-KS patients. These differences were specific to AIDS-KS for IFN-γ and IL-10 and to HIV infection for IL-6 TNF- α. Regarding IL-6, our findings are in agreement with the well-characterized increase in plasma IL-6 in HIV-positive patients even under effective antiretroviral therapy (Knowlton *et al*., 2014; Neuhaus *et al*., 2010). Increased productions of IL-6, as well as TNF-α have been reported in B cells exposed to HHV-8 (Knowlton *et al*., 2014). TNF-α up-regulation was also reported in serum collected within one year prior to KS diagnostic in HIV and HHV-8 infected patients (Knowlton *et al*., 2014). INF-γ up-regulation observed in AIDS-KS plasma might reflect its known production by PBMC from KS patients and its implication in KS pathophysiology, as previously reported (Sirianni *et al*., 1998) and is

coherent with the KS progression observed in patients treated with IFN-γ (Albrecht *et al*., 1994; Ganser *et al*., 1986; Krigel *et al*., 1985; Sirianni *et al*., 1998). Finally, IL-10 up-regulation in AIDS-KS plasma corroborates Machado et coll. findings, who reported higher circulating IL-10 levels in AIDS-KS *versus* classic-KS or HIV non-KS patients, especially in the disseminated disease (Machado *et al*., 2014). This deregulation could contribute to evasion of cell-mediated immune response against HHV-8, as it was observed in EBV infection (Irons and Le, 2008; Kanno *et al*., 1997). Aforementioned inflammatory cytokines have been proposed to promote the recruitment of circulating cells into tissue, through the induction of chemotactic molecules (Ensoli *et al*., 2001).

Our study reports for the first time the simultaneous *in situ* up-regulation of CXCL12, CXCR4 and CXCR7 in AIDS- and classic-KS. These deregulations correlated with lesion severity, latent viral load, proliferation and angiogenesis, suggesting an involvement of the trio in this HHV-8-related cancer. Our results further indicate that the trio could be used in KS rather as a histologic than a circulating biomarker.

Materials and Methods:

Patients, samples and ethics statement

The 12 patients included in ANRS 154 Lenakap clinical trial were analyzed in this sub-study. Descriptions of patients and controls-groups: angioma patients, Classic-KS patients, healthy donors and HIV infected patients without KS are provided in Supplemental table 1. Skin biopsies and plasma samples from controls-groups were provided as described in supplemental material and methods and compared to those from Lenakap patients.

The study was conducted in accordance with good clinical practice guidelines, national laws and the Declaration of Helsinki principles. The institutional ethics review board committee of Paris Ile de France VII approved the study, analyses of skin biopsies and plasma samples from clinical and archived material. All Lenakap patients provided written informed consent

before participation in the study.

Immunohistochemistry, immunofluorescence and protein quantification

Immunohistochemical (IHC) and immunofluorescent (IF) staining were performed as described in the supplemental material and methods and supplemental Table 2. After IHC and IF, slides were scanned using the digital HPF-NanoZommer® 2.0-HT (Hamamatsu, Massy, France) microscope. Histological KS lesion stages were determined by two independent investigators (AD and AC) after Hematoxylin and eosin staining. Protein expressions were quantified using a standardized semi-automatic quantification, as described in supplemental material and methods.

Plasma samples and cytokines plasma concentrations

Plasma samples processing are described in the supplemental material and methods. Soluble factors were measured using ELISA and multiplex assay, as described in supplemental material and methods. Plasma samples obtained at ANRS 154 Lenakap trial baseline were used for assessing cytokines levels and compared to those measured in healthy donors and in HIV non-KS patient.

Statistical analysis

Analyses were performed with IBM SPSS statistics software version 22.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and are detailed in supplemental material and methods. All reported P values were two-tailed, with a significance level of 0.05.

Conflict of Interest:

The authors state no conflict of interest.

Acknowledgements:

The National Institute of Health and Medical Research - French National Agency for Research on Aids and Viral Hepatitis (Inserm-ANRS) is the sponsor of the trial and the study was conducted with the support of Celgene. AD, FG, CD, FB, KB and VM-P are members of the Laboratoire d'Excellence en Recherche sur le Médicament et l'Innovation Thérapeutique, supported by ANR grant ANR-10-LABX-33 under the program "Investissements d'Avenir" ANR-11-IDEX-0003-01. AD was a fellowship recipient from the Assistance Publique–Hôpitaux de Paris. The work performed by Nicolas Dupin and Agnès Carlotti was partially financed by a grant from Institut National du Cancer (Inca). We acknowledge Patrice Hémon for assistance with Visilog® software algorithm programming, Anne Audebourg of the Cochin anatomopathology department for controls-groups skin biopsies processing and Karine Bailly of the Cochin Cytometry and Immunobiology Facility for the multiplex data acquisition.

References:

Albrecht H, Stellbrink HJ, Gross G, *et al*. (1994) Treatment of atypical leishmaniasis with interferon gamma resulting in progression of Kaposi's sarcoma in an AIDS patient. *Clin Investig* 72:1041-7.

Arasteh K, Hannah A (2000) The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in AIDS-related Kaposi's sarcoma. *Oncologist* 5 Suppl 1:28-31.

Cornali E, Zietz C, Benelli R, *et al*. (1996) Vascular endothelial growth factor regulates angiogenesis and vascular permeability in Kaposi's sarcoma. *Am J Pathol* 149:1851-69.

De Thier F, Simonart T, Hermans P, *et al*. (1999) Early- and late-stage Kaposi's sarcoma lesions exhibit similar proliferation fraction. *Am J Dermatopathol* 21:25-7.

Don-Salu-Hewage AS, Chan SY, McAndrews KM, *et al*. (2013) Cysteine (C)-x-C receptor 4 undergoes transportin 1-dependent nuclear localization and remains functional at the nucleus of metastatic prostate cancer cells. *PLoS One* 8:e57194.

Duda DG, Kozin SV, Kirkpatrick ND, *et al*. (2011) CXCL12 (SDF1alpha)-CXCR4/CXCR7 pathway inhibition: an emerging sensitizer for anticancer therapies? *Clin Cancer Res* 17:2074-80.

Dupin N, Fisher C, Kellam P, *et al*. (1999) Distribution of human herpesvirus-8 latently infected cells in Kaposi's sarcoma, multicentric Castleman's disease, and primary effusion lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:4546-51.

Ensoli B, Sgadari C, Barillari G, *et al*. (2001) Biology of Kaposi's sarcoma. *Eur J Cancer* 37:1251-69.

Flepisi BT, Bouic P, Sissolak G, *et al*. (2014) Biomarkers of HIV-associated Cancer. *Biomark Cancer* 6:11-20.

Ford PW, Hamden KE, Whitman AG, *et al*. (2004) Vascular endothelial growth factor augments human herpesvirus-8 (HHV-8/KSHV) infection. *Cancer Biol Ther* 3:876-81.

Freitas C, Desnoyer A, Meuris F, *et al*. (2014) The relevance of the chemokine receptor ACKR3/CXCR7 on CXCL12-mediated effects in cancers with a focus on virus-related cancers. *Cytokine Growth Factor Rev* 25:307-16.

Ganser A, Brucher W, Brodt HR, *et al*. (1986) Treatment of AIDS-related Kaposi's sarcoma with recombinant gamma-interferon. *Onkologie* 9:163-6.

Gerdes J, Li L, Schlueter C, *et al*. (1991) Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol* 138:867-73.

Grundhoff A, Ganem D (2004) Inefficient establishment of KSHV latency suggests an additional role for continued lytic replication in Kaposi sarcoma pathogenesis. *J Clin Invest* 113:124-36.

Hattermann K, Mentlein R (2013) An infernal trio: the chemokine CXCL12 and its receptors CXCR4 and CXCR7 in tumor biology. *Ann Anat* 195:103-10.

Haupt HM, Stern JB, Multhaupt H, *et al*. (1995) Argyrophilic nucleolar organizer regions and proliferating cell nuclear antigen/cyclin in Kaposi's sarcoma. Comparison with morphology and with immunoperoxidase staining for factor VIII-related antigen. *Arch Pathol Lab Med* 119:538-41.

Heckman-Stoddard BM (2012) Oncology biomarkers: discovery, validation, and clinical use. *Semin Oncol Nurs* 28:93-8.

Hengge UR, Ruzicka T, Tyring SK, *et al*. (2002a) Update on Kaposi's sarcoma and other HHV8 associated diseases. Part 1: epidemiology, environmental predispositions, clinical manifestations, and therapy. *Lancet Infect Dis* 2:281-92.

Hengge UR, Ruzicka T, Tyring SK, *et al*. (2002b) Update on Kaposi's sarcoma and other HHV8 associated diseases. Part 2: pathogenesis, Castleman's disease, and pleural effusion lymphoma. *Lancet Infect Dis* 2:344-52.

Hleyhel M, Belot A, Bouvier AM, *et al*. (2013) Risk of AIDS-defining cancers among HIV-1-infected patients in France between 1992 and 2009: results from the FHDH-ANRS CO4 cohort. *Clin Infect Dis* 57:1638-47.

Hodak E, Hammel I, Feinmesser M, *et al*. (1999) Differential expression of p53 and Ki-67 proteins in classic and iatrogenic Kaposi's sarcoma. *Am J Dermatopathol* 21:138-45.

Hosseini-Moghaddam SM, Soleimanirahbar A, Mazzulli T, *et al*. (2012) Post renal transplantation Kaposi's sarcoma: a review of its epidemiology, pathogenesis, diagnosis, clinical aspects, and therapy. *Transpl Infect Dis* 14:338-45.

Irons RD, Le AT (2008) Dithiocarbamates and viral IL-10 collaborate in the immortalization and evasion of immune response in EBV-infected human B lymphocytes. *Chem Biol Interact* 172:81-92.

Kanno H, Naka N, Yasunaga Y, *et al*. (1997) Production of the immunosuppressive cytokine interleukin-10 by Epstein-Barr-virus-expressing pyothorax-associated lymphoma: possible role in the development of overt lymphoma in immunocompetent hosts. *Am J Pathol* 150:349-57.

Knowlton ER, Rappocciolo G, Piazza P, *et al*. (2014) Human herpesvirus 8 induces polyfunctional B lymphocytes that drive Kaposi's sarcoma. *MBio* 5:e01277-14.

Krigel RL, Odajnyk CM, Laubenstein LJ, *et al*. (1985) Therapeutic trial of interferon-gamma in patients with epidemic Kaposi's sarcoma. *J Biol Response Mod* 4:358-64.

Lagane B, Chow KY, Balabanian K, *et al*. (2008) CXCR4 dimerization and beta-arrestin-mediated signaling account for the enhanced chemotaxis to CXCL12 in WHIM syndrome. *Blood* 112:34-44.

Liang Z, Brooks J, Willard M, *et al*. (2007) CXCR4/CXCL12 axis promotes VEGF-mediated tumor angiogenesis through Akt signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 359:716-22.

Lin L, Han MM, Wang F, *et al*. (2014) CXCR7 stimulates MAPK signaling to regulate hepatocellular carcinoma progression. *Cell Death Dis* 5:e1488.

Long E, Ilie M, Hofman V, *et al*. (2009) LANA-1, Bcl-2, Mcl-1 and HIF-1alpha protein expression in HIV-associated Kaposi sarcoma. *Virchows Arch* 455:159-70.

Lu J, Jha HC, Verma SC, *et al*. (2014) Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded LANA contributes to viral latent replication by activating phosphorylation of survivin. *J Virol* 88:4204-17.

Machado PR, Farias KJ, Genre J, *et al*. (2014) Disseminated Kaposi's sarcoma in patients with HIV infection correlates to high serum levels of IL-10. *Viral Immunol* 27:356-60.

Masuda T, Nakashima Y, Ando K, *et al*. (2014) Nuclear expression of chemokine receptor CXCR4 indicates poorer prognosis in gastric cancer. *Anticancer Res* 34:6397-403.

Miyoshi K, Kohashi K, Fushimi F, *et al*. (2014) Close correlation between CXCR4 and VEGF expression and frequent CXCR7 expression in rhabdomyosarcoma. *Hum Pathol* 45:1900-9.

Neuhaus J, Jacobs DR, Jr., Baker JV, *et al*. (2010) Markers of inflammation, coagulation, and renal function are elevated in adults with HIV infection. *J Infect Dis* 201:1788-95.

Ozen O, Bilezikci B, Celasun B, *et al*. (2005) Ki-67 proliferation index in Kaposi's sarcoma after renal transplantation: findings in skin-only cases versus cases with internal-organ involvement. *Transplant Proc* 37:2190-4.

Pablos JL, Amara A, Bouloc A, *et al*. (1999) Stromal-cell derived factor is expressed by dendritic cells and endothelium in human skin. *Am J Pathol* 155:1577-86.

Penin RM, Fernandez-Figueras MT, Puig L, *et al*. (2002) Over-expression of p45(SKP2) in Kaposi's sarcoma correlates with higher tumor stage and extracutaneous involvement but is not directly related to p27(KIP1) down-regulation. *Mod Pathol* 15:1227-35.

Punj V, Matta H, Schamus S, *et al*. (2010) Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded viral FLICE inhibitory protein (vFLIP) K13 suppresses CXCR4 expression by upregulating miR-146a. *Oncogene* 29:1835-44.

Raggo C, Ruhl R, McAllister S, *et al*. (2005) Novel cellular genes essential for transformation of endothelial cells by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Cancer Res* 65:5084-95.

Rubinstein PG, Aboulafia DM, Zloza A (2014) Malignancies in HIV/AIDS: from epidemiology to therapeutic challenges. *AIDS* 28:453-65.

Samaniego F, Markham PD, Gendelman R, *et al*. (1998) Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor present in Kaposi's sarcoma (KS) are induced by

inflammatory cytokines and synergize to promote vascular permeability and KS lesion development. *Am J Pathol* 152:1433-43.

Sirianni MC, Vincenzi L, Fiorelli V, *et al*. (1998) gamma-Interferon production in peripheral blood mononuclear cells and tumor infiltrating lymphocytes from Kaposi's sarcoma patients: correlation with the presence of human herpesvirus-8 in peripheral blood mononuclear cells and lesional macrophages. *Blood* 91:968-76.

Speetjens FM, Liefers GJ, Korbee CJ, *et al*. (2009) Nuclear localization of CXCR4 determines prognosis for colorectal cancer patients. *Cancer Microenviron* 2:1-7.

Sun X, Cheng G, Hao M, *et al*. (2010) CXCL12 / CXCR4 / CXCR7 chemokine axis and cancer progression. *Cancer Metastasis Rev* 29:709-22.

Trojani M, Contesso G, Coindre JM, *et al*. (1984) Soft-tissue sarcomas of adults; study of pathological prognostic variables and definition of a histopathological grading system. *Int J Cancer* 33:37-42.

Uccini S, Scarpino S, Ballarini F, *et al*. (2003) In situ study of chemokine and chemokine-receptor expression in Kaposi sarcoma. *Am J Dermatopathol* 25:377-83.

Volin MV, Joseph L, Shockley MS, *et al*. (1998) Chemokine receptor CXCR4 expression in endothelium. *Biochem Biophys Res Commun* 242:46-53.

Wang JF, Liu ZY, Anand AR, *et al*. (2004) Alpha-chemokine-mediated signal transduction in human Kaposi's sarcoma spindle cells. *Biochim Biophys Acta* 1691:129-39.

Wang L, Wang Z, Yang B, *et al*. (2009) CXCR4 nuclear localization follows binding of its ligand SDF-1 and occurs in metastatic but not primary renal cell carcinoma. *Oncol Rep* 22:1333-9.

Wang LH, Liu Q, Xu B, *et al*. (2010) Identification of nuclear localization sequence of CXCR4 in renal cell carcinoma by constructing expression plasmids of different deletants. *Plasmid* 63:68-72.

Yao L, Salvucci O, Cardones AR, *et al*. (2003) Selective expression of stromal-derived factor-1 in the capillary vascular endothelium plays a role in Kaposi sarcoma pathogenesis. *Blood* 102:3900-5.

Zgraggen S, Huggenberger R, Kerl K, *et al*. (2014) An important role of the SDF-1/CXCR4 axis in chronic skin inflammation. *PLoS One* 9:e93665.

Zheng K, Li HY, Su XL, *et al*. (2010) Chemokine receptor CXCR7 regulates the invasion, angiogenesis and tumor growth of human hepatocellular carcinoma cells. *J Exp Clin Cancer Res* 29:31.

Tables:

Table 1: Cytokines involved in KS plasmatic levels

A	Baseline n= 10 (pg/ml)		Change from baseline to lenalidomide patient's endpoint n = 10 (pg/ml)			Change in non progressive patients n = 7 (pg/ml)		Change in progressive patients n = 3 (pg/ml)		
Cytokine	Median	Range	Median	range	p[1]	Median	Range	Median	Range	p[2]
CXCL12	2911	2536 - 3538	421	-345 ; 810	**0.017**	391	-345 ; 640	510	249 ; 810	0.517

B	Healthy donnors n = 13 (pg/ml)	Range	HIV non-KS patients n = 12 (pg/ml)	Range	AIDS-KS patients n = 12 (pg/ml)	Range	p[3]
Cytokines							
CXCL12	2921.92	1748 - 3998	2986.32	2168 - 3598	3071.26	2536 - 3584	0.615
IFN-γ	3.29	0.77 – 11.71	4.18	0.26 – 9.38	**6.48** [4,5]	1.57 – 14.07	**0.053**
TNF-α	1.20	0.02 – 2.05	1.49	0.03 – 3.41	**1.63** [4]	1.16 – 3.85	**0.037**
IL-1b	0.08	0.02 – 0.80	0.09	0.02 – 0.29	0.11	0.05 – 0.19	0.702
IL-4	0.05	0.01 – 0.08	0.04	0.02 – 0.29	0.07	0.01 – 0.21	0.342
IL-6	0.34	0.16 – 0.56	**0.67** [4]	0.16 – 2.13	**0.82** [4]	0.35 – 25.52	**0.001**
IL-8	1.40	0.18 – 8.47	3.04	0.16 – 9.24	3.39	1.03 – 6.69	0.120
IL-10	0.18	0.03 – 0.34	0.18	0.02 – 0.43	**0.53** [4,5]	0.09 – 11.65	**0.006**
IL-12p70	0.16	0.06 – 0.25	0.11	0.05 – 0.62	0.11	0.05 – 0.43	0.274
IL-17-A	0.81	0.50 – 1.52	1.13	0.51 – 1.50	0.96	0.37 – 2.01	0.199
VEGF-A	23.56	10.9 – 217.8	30.75	14.0 – 218.6	41.88	13.5 – 147.6	0.255

A: Evaluation of changes in CXCL12 plasmatic level during ANRS 154 Lenakap study, as predictor of KS progression
B: Cytokines profile in AIDS-KS patients versus healthy and HIV-non KS patients
Abbreviations: AIDS-KS: Kaposi's sarcoma associated with HIV infection, HIV non-KS: HIV-infected patients without Kaposi's sarcoma, n: number, KS: Kaposi's sarcoma, IFN: interferon, IL: interleukin, TNF: c, VEGF-A: vascular endothelial growth factor.
Bold: $P<0.05$
[1] Nonparametric analysis of change in cytokines levels (Baseline - Endpoint) performed using Wilcoxon signed rank test.
[2] Nonparametric analysis performed using Mann-Whitney test
[3] Nonparametric analysis performed using Kruskall-Wallis test
[4] Significantly different from healthy donors using Mann-Whitney test
[5] Significantly different from HIV non-KS patients using Mann-Whitney test

Figure 1

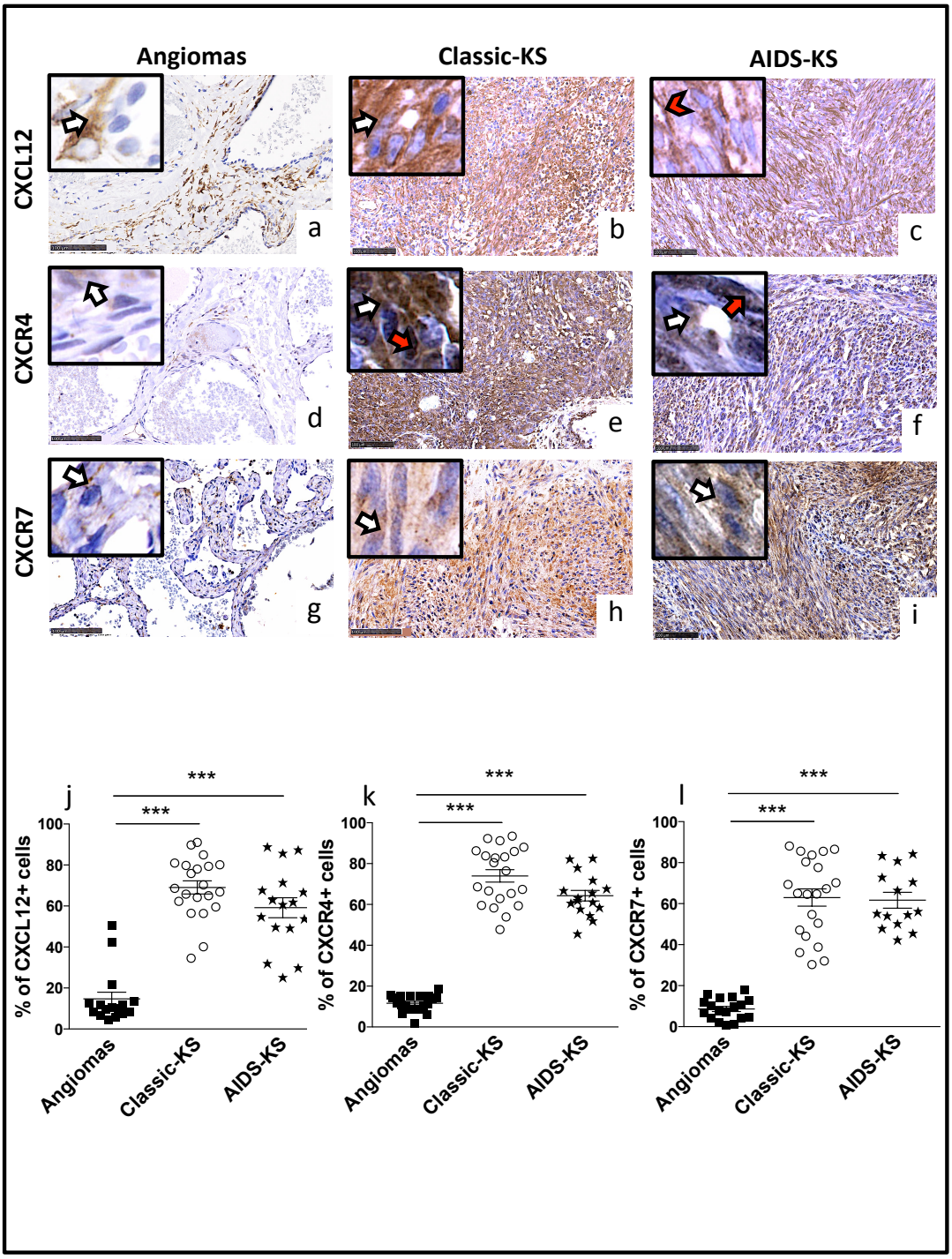


Figure 1 : CXCL12, CXCR4, CXCR7 are up-regulated in KS lesions.

(a-i) Immunohistological staining in representative lesions of angiomas, classic-KS and AIDS-KS for **(a-c)** CXCL12, **(d-f)** CXCR4 and **(g-i)** CXCR7. Original magnification X200, box X800, scale bar=100µm. White arrow: cytoplasmic staining, red arrowhead: cytoplasmic with strong membrane staining, red arrow: nuclear staining. **(j-l)** Percentage of endothelial and/or spindle cells expressing **(j)** CXCL12, **(k)** CXCR4 and **(l)** CXCR7 on 10 consecutive fields (magnification X400). Black squares: angiomas, white circles: classic-KS, black stars: AIDS-KS lesions. Bars represent mean values ± SEM. Statistical significance determined using Mann-Whitney test. ***P<0.0001. KS: Kaposi's sarcoma.

Figure 2

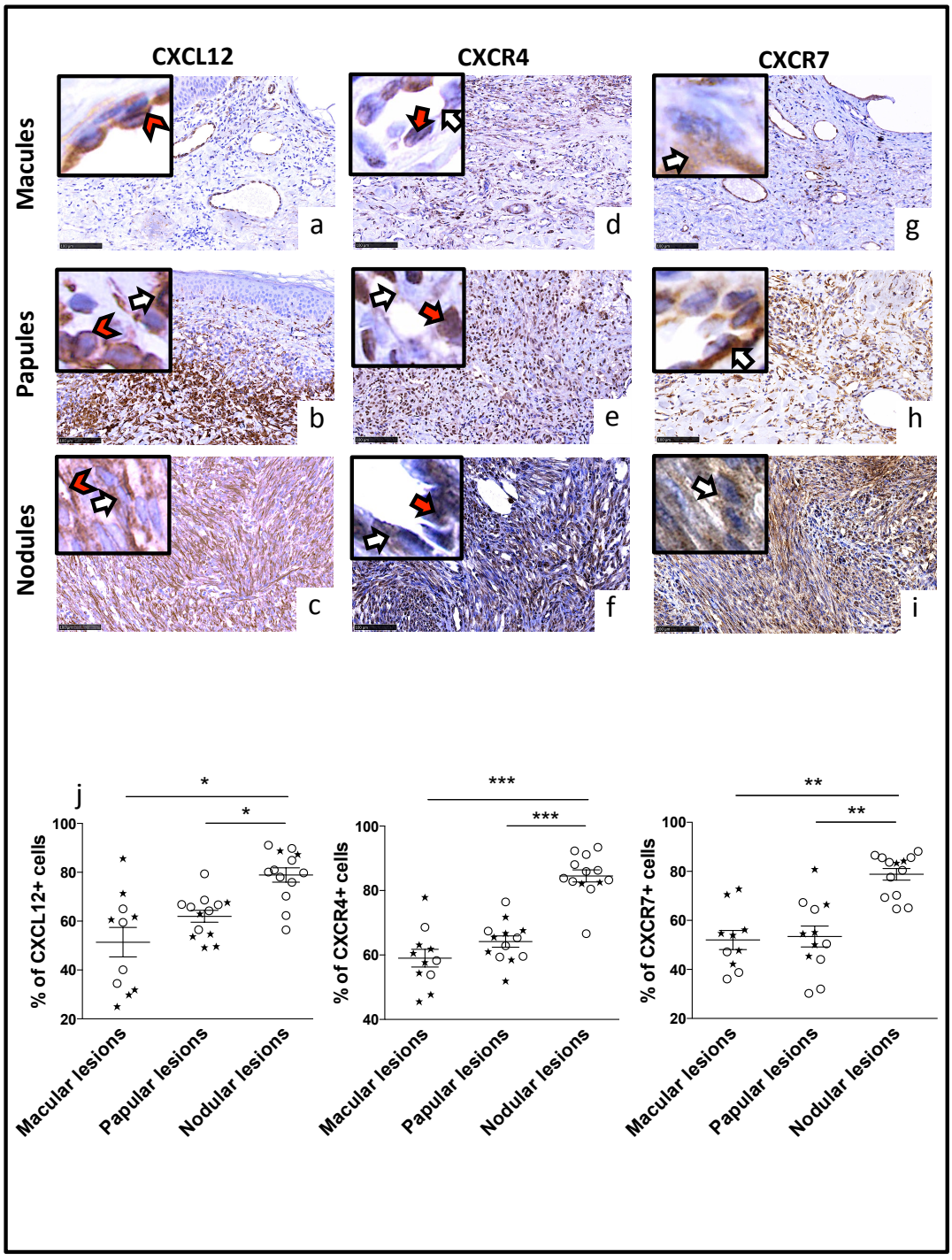


Figure 2: CXCL12, CXCR4, CXCR7 are associated with KS lesions severity.
(a-i) Immunohistological staining in representative macules, papules and nodules (n=16) from AIDS- and classic-KS for **(a-c)** CXCL12, **(d-f)** CXCR4 and **(g-i)** CXCR7. Original magnification X200, box X800, scale bar=100µm. White-arrow: cytoplasmic-staining, red-arrowhead: cytoplasmic with strong membrane staining, red-arrow: nuclear-staining. **(j-l)** Percentage of endothelial and/or spindle cells expressing (j) CXCL12, (k) CXCR4 and (l) CXCR7 on 10 consecutive fields (magnification X400), depending on lesions stage. White circles: classic-KS, black stars: AIDS-KS lesions. Bars represent mean values ± SEM. Statistical significance determined using Mann-Whitney test. **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001. KS: Kaposi's sarcoma.

Figure 3

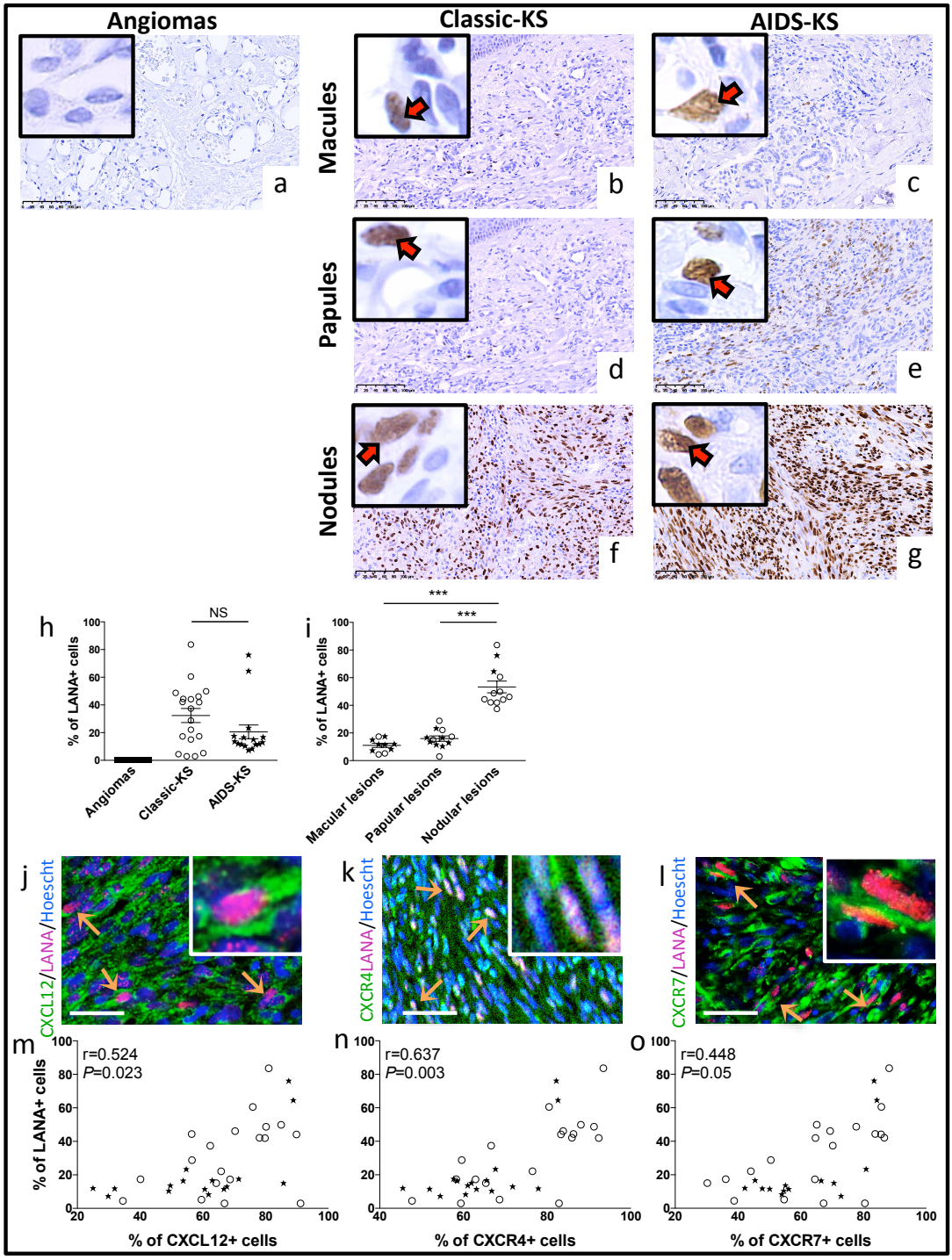


Figure 3: CXCL12, CXCR4, CXCR7 expressions correlate with LANA in KS lesions.

(a-i) LANA immunohistological staining in representative angiomas (**a**), classic-KS and AIDS-KS, for **(b, c)** macules, **(d, e)** papules and **(f, g)** nodules. Magnification X200, box X800, bar=100µm. Red-arrow: nuclear-staining. **(h, i)** Percentage of LANA$^+$ endothelial and spindle cells **(h)** in angiomas, classic-KS and AIDS-KS **(i)** in macules, papules and nodules. Bars: mean ± SEM. Statistical significance: Mann-Whitney test. ***P<0.0001. **(j-l)** Most LANA$^+$ cells (red) co-stained (orange-arrow) with (**j**) CXCL12, (**k**) CXCR4 and (**l**) CXCR7 (green). Nuclei stained with Hoechst. Magnification X400, box X800, bar=50µm **(m-o)** Correlation (Spearman's test) between % of LANA$^+$ cells and % of **(m)** CXCL12$^+$, **(n)** CXCR4$^+$ and **(o)** CXCR7$^+$ cells. Black-squares: angiomas, white-circles: classic-KS, black-stars: AIDS-KS.

Figure 4

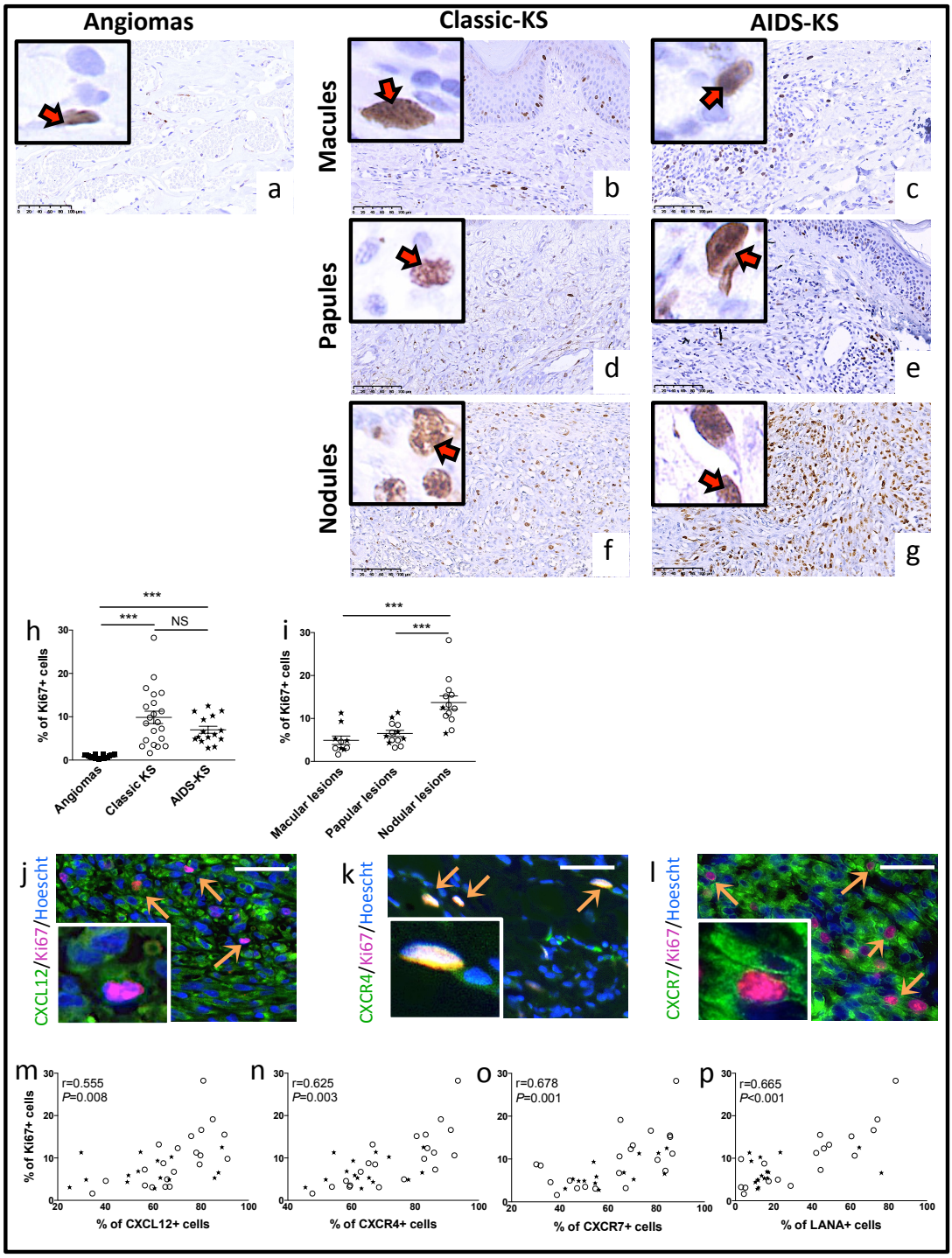


Figure 4: CXCL12, CXCR4, CXCR7 expressions correlate with Ki67 in KS lesions.

(a-i) Ki67 immunohistological staining in representative angiomas (**a**), classic-KS and AIDS-KS, for (**b, c**) macules, (**d, e**) papules and (**f, g**) nodules. Magnification X200, box X800, bar=100µm. Red arrow: nuclear-staining. **(h, i)** Percentage of Ki67$^+$ endothelial and spindle cells in (**h**) angiomas, classic-KS and AIDS-KS, (**i**) in macules, papules and nodules. Bars: mean ± SEM. Statistical significance: Mann-Whitney test. ***P<0.0001. **(j-l)** Most Ki67$^+$ cells (red) co-stained (orange-arrow) with (**j**) CXCL12, (**k**) CXCR4 and (**l**) CXCR7 (green). Nuclei stained with Hoechst. Magnification X400, box X800, bar=50µm (**m-p**) Correlation (Spearman's test) between % of Ki67$^+$ cells and % of (**m**) CXCL12$^+$, (**n**) CXCR4$^+$, (**o**) CXCR7$^+$ and (**p**) LANA$^+$ cells. Black-squares: angiomas, white-circles: classic-KS, black-stars: AIDS-KS.

Figure 5

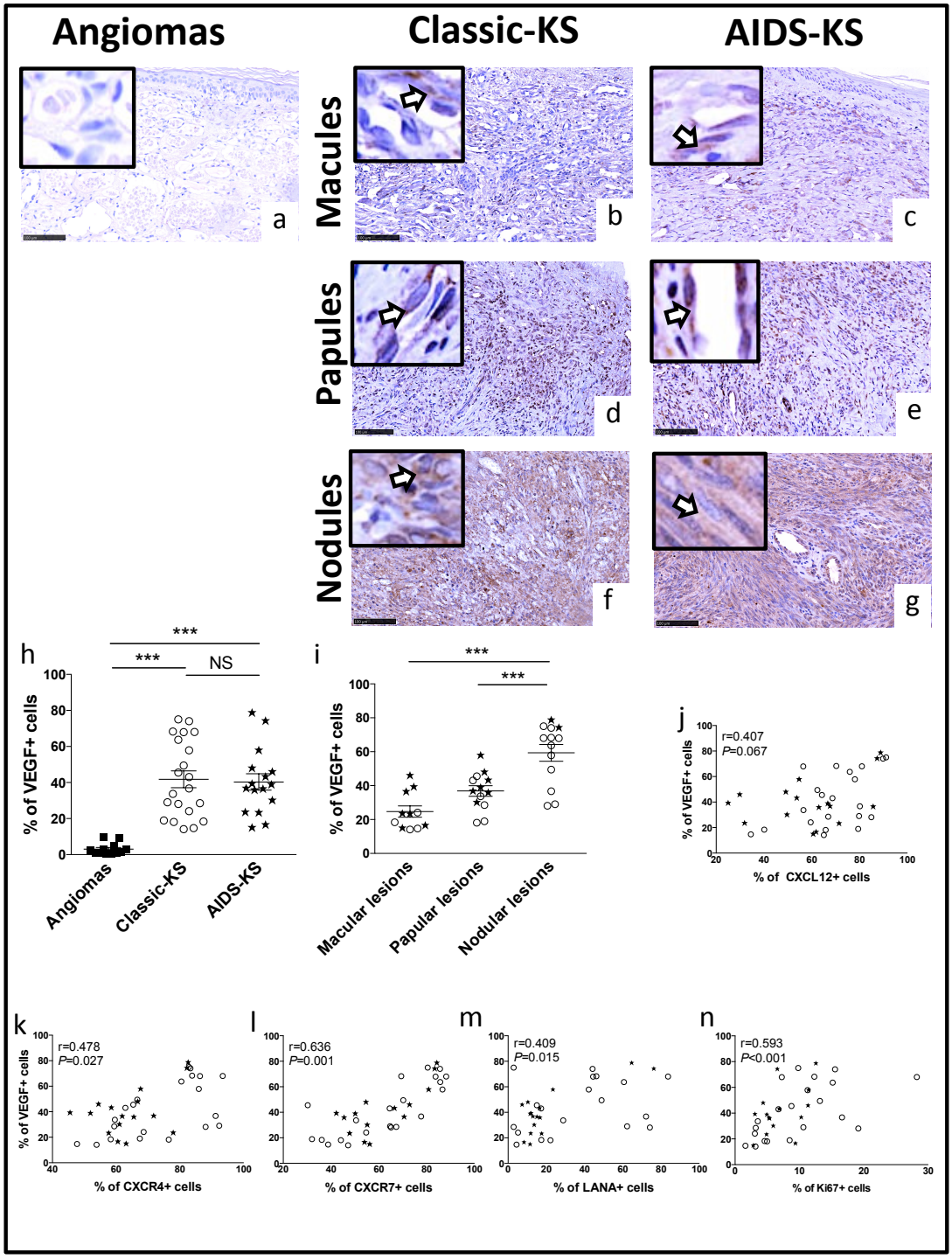


Figure 5: CXCL12 receptors expressions correlate with VEGF in KS lesions.

(a-i) VEGF immunohistological staining in representative angiomas (**a**), classic-KS and AIDS-KS, for (**b, c**) macules, (**d, e**) papules and (**f, g**) nodules. Magnification X200, box X800, bar=100µm. Red arrow: nuclear staining. **(h, i)** Percentage of VEGF$^+$ endothelial and spindle cells in **(h)** angiomas, classic-KS and AIDS-KS, **(i)** in macules, papules and nodules lesions. Bars: mean values ± SEM. Statistical significance: Mann-Whitney test. ***P<0.0001. **(j-l)** Correlation (Spearman's test) between % of VEGF$^+$ cells and % of **(j)** CXCL12$^+$, **(k)** CXCR4$^+$, **(l)** CXCR7$^+$, (m) LANA$^+$ and (n) Ki67$^+$ cells. Black-squares: angiomas, white-circles: classic-KS, black-stars: AIDS-KS.

Supplementary Material:

Supplemental Material and methods:

Patients

Criteria for eligibility of patients were those of ANRS 154 Lenakap trial (Martinez-Pourcher et al, Phase II trial of lenalidomide in patients with HIV-associated Kaposi's sarcoma receiving antiretroviral therapy: Results of the ANRS 154 Lenakap Trial. *in preparation*).

Formalin-fixed and paraffin-embedded skin biopsies from angiomas and classic-KS were provided by archival materials from patient treated at Cochin Hospital (Service d'Anatomie et cytologie pathologiques, Paris, France).

Plasma samples from healthy donors were obtained from the Etablissement Français du Sang and the HIV non-KS plasma samples were provided by archival materials from patients treated at Antoine Béclère Hospital (service de microbiologie-immunologie biologique, Clamart, France).

Sample processing

Immunohistochemical (IHC) and immunofluorescent (IF) staining were performed on 5µm sections from Formalin-fixed and paraffin-embedded skin biopsies from AIDS-KS, classic-KS and angiomas patients.

Blood samples were collected in heparinized tubes and centrifuged at 1000 *g* for 15 minutes, followed by centrifugation of the separated plasma at 10 000 *g* for 10 minutes at 2-8°C to ensure complete platelet removal. Plasma specimens were stored at -80°C until analysis. Blood samples from Lenakap's patients collected at baseline (before starting lenalidomide treatment) and lenalidomide' endpoint were used for cytokine assays.

Immunohistochemistry, immunofluorescence

IHC staining was carried out for CXCL12, CXCR4, CXCR7, LANA, Ki67 and VEGF, IF double-staining was performed for CXCL12, CXCR4, CXCR7 with LANA and Ki67. The paraffin was removed by incubation in xylene and sections were rehydrated in a graded series of ethanol solutions and washed in 1X phosphate-buffered saline (PBS). Antigens were unmasked by incubation in citrate buffer pH6 (Dako, Trappes, France) and heating to 90°C in a microwave oven. Sections were then incubated with appropriate primary antibody (Ab) under conditioned detailed in Table S2. For, IHC staining, the sections were washed and incubated with a biotinylated secondary Ab for 1h at room temperature (except for biotinylated primary Ab), and then with streptavidin-horseradish peroxidase complex (LSAB kit, Dako). Sections were then counterstained with hematoxylin.

For IF, the sections were washed and incubated with streptavidine or a secondary Ab labelled with a specific dye as described in Supplemental Table 2, during 1hour at room temperature. Section where then washed in PBS 1X and incubated with the second appropriate primary Ab under conditioned detailed in Supplemental Table 2 and once again washed and incubated with streptavidine or a secondary Ab labelled with a specific dye, combined with DAPI (1:500) to stain nuclei for 1hour at room temperature.

Corresponding isotype- and species-matched Abs were used as negative controls (Supplemental Table 2).

Proteins quantification

Protein expressions were quantified using the French Federation of Cancer Centers Sarcoma Group grading systems (Trojani *et al*., 1984), by two independent investigators (AD and FG) blinded to the characteristic of the patients. Digitalized slides were analyzed using the Visilog® 7.0 Professional Software (Noesis, Gif-sur-Yvette, France). Two algorithms were

program to detect nuclei or plasmatic staining in order to allow a standardized semi-automatic quantification. The detection baseline was adapted to the isotype control, and all images were acquired and analyzed using identical hardware and software settings. Areas where proteins were highly expressed by endothelial and spindle cells were studied at magnification X 250. Areas of tumor stroma or without an endothelial cellularity were excluded. The percentage of positive endothelial and spindle cells was determined for each protein at X 400 on 10 successive fields mostly composed of endothelial and spindle cells. Percentage of positive cells is presented as the total number of positive cells compared to total number of cells on the 10 successive fields.

Cytokines plasma concentrations

CXCL12 concentrations were measured in duplicates in plasma samples obtained at baseline and at lenalidomide treatment's endpoint using the Human CXCL12 Quantikine ELISA kit (R&D systems), in accordance with to the manufacturer's protocol. Concentrations of IFN-γ, TNF-α, VEGF-A, IL-1β, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 and IL-17A were measured in duplicates using a multiplex electrochimioluminescence assay, the V-Plex™ Custom Human Cytokine Assay (Meso-Scale Discovery). These experiments and lower limits of quantification (LOQ) are described elsewhere (Martinez-Pourcher et al, Phase II trial of lenalidomide in patients with HIV-associated Kaposi's sarcoma receiving antiretroviral therapy: Results of the ANRS 154 Lenakap Trial. *in preparation*). By convention, concentrations below the LOQ were defined as LOQ/2 for statistical analysis.

Statistical analysis

Variables were summarized as proportions for categorical variables, the median and interquartile range (IQR), minimum and maximum for continuous variables. Results are presented as median (IQR) or median (range).

For protein quantification, as some patients had two or more values, we generated 100 bootstrap samples where for each individual, we selected the single value for those with a single evaluation and we randomly selected one value out of the different evaluation for those with two or more evaluations. Then, on each sample, we applied the Mann-Whitney test to compare continuous variables between groups and the Spearman correlation test to examine the associations between continuous variables, and we calculated the mean of p-values and correlation coefficients estimated with each sample. The Mann-Whitney non-parametric test was used to compare change in cytokine parameters between patients with Kaposi progression and those with stable disease at week treatment endpoint.

Supplemental Table 1: Demographic and clinical data of study populations

	AIDS-KS (n=12)	Classic-KS (n=12)	Angioma (n=10)	HIV non-KS (n=12)	Healthy (n=13)
Samples number[1]					
- SBs	16	21	20	0	0
- Plasma samples	20	0	0	12	13
Lesion types[2]					
- Macular lesions	7 (43.8)	4 (19)	NA	NA	NA
- Papular lesions	7 (43.8)	6 (29)	NA	NA	NA
- Nodular lesions	2 (12.5)	11 (52)	NA	NA	NA
Age[3]	48 (40-52)	75 (69-80)	63 (46-68)	43 (40-52)	45 (33-52)
P value[4]		**<0.0001**	**0.037**	0.831	0.925
Male sex[2]	12 (100)	11 (92)	9 (90)	11 (100)	13 (100)
Ethnic origins[2]					
- Caucasian	9 (75)	11 (92)	6 (60)	9 (82)	13 (100)
- Africans	3 (25)	1 (8)	4 (40)	2 (18)	0 (0)
KS duration[3]	5 (0.8-20.0)	6 (3.3-8.8)	NA	NA	NA
P value[4]		0.623	NA	NA	NA
CD4[5]/mm[3]	444 (286–612)	697 (475-1158)	ND	595 (407-676)	ND
P value[4]		**0.036**	NA	0.100	NA
HIV RNA ≤ 50 copies per mL[2]	12 (100)	NA	NA	12 (100)	NA
cART[1]					
- 2NRTIs+PI/r	7	NA	NA	8	NA
- 2NRTIs+NNRTI	2	NA	NA	2	NA
- Others[6] :	3	NA	NA	2	NA
Previous KS treatment[5]	4.5 (1.3–6)	1 (0-2.5)	NA	NA	NA
P value[4]		**0.0005**	NA	NA	NA

The AIDS-KS patients were significantly younger than classic-KS and angioma patients, but no statistical difference was observed with healthy donors and with HIV non-KS. AIDS-KS patients also differed significantly from classic-KS, but not from HIV non-KS patients in terms of $CD4^+$ T-cell count. All HIV infected patients presented an HIV plasma viral load < 50 copies/ml. The characteristics of the five study groups are summarized in Supplemental Table 1.

Abbreviations: AIDS-KS: Kaposi's sarcoma associated with HIV infection, Classic-KS: classic Kaposi's sarcoma form, SBs: skin biopsies, HIV non-KS: HIV-infected patients without Kaposi's sarcoma, Healthy: healthy donnors, n: number, KS: Kaposi's sarcoma, IQR: interquartile range, CD4: CD4 positive T cells, cART: combined antiretroviral therapy, NRTIs: nucleoside reverse transcriptase inhibitors, NNRTI: non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor, PI/r: ritonavir-boosted protease inhibitor, NA: Not adapted, ND: not determined.

[1] Data are given as number

[2] Data are given as number (%)

[3] Data (in year) are given as median and interquartile ratio (IQR25%-IQR75%) values

[4] Mann-Whitney test (each subgroup of patients versus AIDS-KS subgroup). Bold: $P<0.05$

[5] Data are given as mean number and interquartile ratio (IQR25%-IQR75%)

[6] Other: 2NRTI+II, 2NRTI+PI/r+II or NNRTI+PI/r+II

Supplemental Table 2: Antibodies and conditions used for immunohistochemistry and immunofluorescence

Protein	Procedure	Species	Clone/ Type	Dilution	Incubation	Origin	Isotype
CXCL12	IHC	Mouse	K15C IgG2a	10 µg/ml	4°C overnight	Pasteur Institute (U819 Inserm)	Mouse IgG2a BD Pharmigen
	IF[1]	Rabbit	Poly-clonal	0.5 µg/ml	4°C overnight	Abcam	Rabbit polyclonal R&D System
CXCR4	IHC/IF[2]	Mouse	12G5-Biot IgG2a	15 µg/ml	4°C overnight	eBioscience	Mouse biotinylated-IgG2a BD Pharmigen
CXCR7	IHC	Mouse	11G8 IgG1	10 µg/ml	Room temperature 2h	R&D System	Mouse IgG1 BD Pharmigen
	IF[1]	Rabbit	Poly-clonal	3.3 µg/ml	Room temperature 2h	Proteintech Group	Rabbit polyclonal R&D System
LANA	IHC/IF[3]	Mouse	13B10 IgG1	5 µg/ml	Room temperature 1h	Leica Biosystems	Mouse IgG1 BD Pharmigen
Ki67	IHC/IF[3]	Mouse	MIB1 IgG1κ	0.8 µg/ml	Room temperature 1h	Dako	Mouse IgG1 BD Pharmigen
VEGF	IHC	Mouse	IgG2B	1.25 µg/ml	4°C overnight	R&D System	Mouse IgG2B R&D System

Abbreviations: IHC: immunohistochemical staining, IF: immunofluorescence, Biot: biotinylated, LANA: human herpesvirus-8 latency-associated nuclear antigen, VEGF: vascular endothelial growth factor

Details of antibodies used for IF double staining procedures: Antibodies were, if indicated, labeled with the listed dyes (secondary labeling). [1] Goat AntiRabbit Antibody labeled with Alexa Fluor 488 (Invitrogen), [2] Streptavidine conjugate with Alexa Fluor 488 (Invitrogen), [3] Goat AntiMouse Antibody labeled with Alexa Fluor 594F (Invitrogen)

C. **Résultats et conclusion**

Dans cet article que je signe en premier auteur, nous avons mis en évidence une surexpression simultanée de CXCL12, CXCR4 et CXCR7 dans la MK, indépendante de la forme clinique, corrélée aux stades histologiques des lésions et aux marqueurs physiopathologiques étudiés, suggérant un rôle de biomarqueur histologique du trio. Malheureusement ce rôle n'a pu être confirmé au niveau plasmatique.

Nous avons observé une différence dans l'âge des patients MK-VIH et MK-classique et dans le taux de CD4 des patients de l'essai et des patients VIH sans MK, en accord avec les caractéristiques des formes cliniques de MK. Les marquages étaient sensibles et spécifiques, comme confirmé par l'absence de marquage sur les lames traitées par Ac isotypiques ou par le faible marquage au niveau épidermique par rapport au derme, comme précédemment publié (254, 310).

Dans ce travail, nous avons mis en évidence une augmentation simultanée de la détection des protéines de l'axe CXCL12/CXCR4-CXCR7, dans les lésions des patients inclus dans l'essai clinique ANRS 154 Lenakap, tout comme chez les patients atteints de MK-classique en comparaison à des patients présentant des lésions bénignes à type d'angiome. Ces protéines étaient principalement détectées au niveau dermique, par les lymphocytes, les cellules dendritiques, les cellules endothéliales et les SC. Nous avons observé un marquage cytoplasmique avec un renforcement membranaire pour CXCL12, un marquage cytoplasmique pour CXCR4 avec une détection intranucléaire pour certaines cellules, spécifique aux lésions de MK et un marquage cytoplasmique pour CXCR7. Aucune différence histologique significative n'a été retrouvée entre les lésions de MK-VIH et de MK-classique. Ainsi, l'augmentation de la détection des protéines CXCL12, CXCR4 et CXCR7 semble associée à la MK et non à la présence du VIH.

En l'absence de différence histiotypique entre les lésions de MK-VIH et classique, nous avons étudié l'expression du trio en fonction du stade des lésions de MK. Nous avons ainsi démontré qu'il existait une augmentation de la détection concomitante de CXCL12 et de ses deux récepteurs dans les lésions nodulaires de MK, par rapport aux lésions maculaires et papulaires. En revanche, nous n'avons pas retrouvé de différence significative entre les lésions maculaires et papulaires, considérées comme « pré-tumorales ». Ces résultats confirment la corrélation entre l'expression des protéines du trio et le stade des lésions.

En parallèle, afin d'évaluer si l'axe CXCL12/CXCR4-CXCR7 pouvait constituer un biomarqueur histologique de la MK, nous avons analysé les profils de distribution et la

corrélation avec les protéines LANA et VEGF, connus pour être impliqués dans la physiopathologie de la MK et avec le marqueur de prolifération Ki67, connu pour être augmenté dans la pathologie. Comme attendu, nous avons observé une détection nucléaire de LANA et Ki67 et cytoplasmique de VEGF, dans les lésions de MK-VIH et classique, tandis que de façon prévisible, LANA était indétectable au niveau des lésions d'angiomes et que Ki67 et VEGF étaient très faiblement détectés dans ces lésions. Une nouvelle fois, aucune différence n'a été retrouvée entre les lésions de MK-VIH et classique, avec des marquages principalement observés au niveau des cellules endothéliales entourant les fentes vasculaires et des SC. Ces données nous ont conduit à analyser le profil de détection de ces protéines en fonction du stade des lésions. Nous avons de nouveau rapporté une augmentation de la distribution des trois protagonistes dans les lésions nodulaires par rapport aux lésions maculaires et papulaires, sans qu'il n'y ait de différence entre ces deux derniers types de BC. Ces analyses confirment le profil des lésions de MK, riche en cellules en prolifération, exprimant la protéine LANA et le facteur pro-angiogénique VEGF et ce d'autant plus que le stade des lésions est avancé. Par immunofluorescence, nous avons étudié la co-détection des protéines du trio avec LANA et Ki67 et ainsi mis en évidence que la plupart des cellules exprimant LANA ou en prolifération exprimaient également CXCL12, CXCR4 et CXCR7. Ces résultats suggèrent un effet autocrine et paracrine des protéines du trio sur les cellules, participant probablement à la prolifération et la progression de l'infection des cellules endothéliales et des SC par HHV-8. Nous avons également mis en évidence une corrélation positive entre le pourcentage de cellules endothéliales et de SC positives pour LANA, VEGF ou en prolifération et le pourcentage de celles positives pour CXCL12, CXCR4 ou CXCR7. Ces résultats, sont en faveur d'un rôle de biomarqueur histologique, témoin du processus tumoral, de l'axe CXCL12/CXCR4-CXCR7, dans la MK.

La disponibilité d'un biomarqueur plasmatique, témoin de l'évolution de la maladie, ou de la réponse au traitement, est indispensable pour un suivi facilité et amélioré des patients. Nos résultats nous ont donc conduit à tester si CXCL12 pouvait être un biomarqueur plasmatique témoin du processus physiopathologique de la MK. Nous avons ainsi mesuré, par méthode ELISA, les concentrations plasmatiques de CXCL12, chez les patients MK-VIH avant mise sous lénalidomide et les avons comparés à celles de volontaires sains appariés sur l'âge et le sexe et de patients VIH sans MK, infectés ou non par HHV-8, appariés sur l'âge, le sexe, l'origine ethnique, le taux de lymphocytes T CD4, la charge virale VIH et les combinaisons d'ARV des patients de l'essai. Aucune différence significative n'a été retrouvée

entre les 3 groupes, suggérant l'absence d'analogie entre les concentrations plasmatiques et la détection tissulaire de CXCL12 chez les patients MK-VIH. Ces données sont en défaveur d'un rôle de biomarqueur plasmatique, témoin du processus physiopathologique de la MK, pour CXCL12.

Afin d'étudier le rôle potentiel de biomarqueur plasmatique témoin de l'évolution des patients sous lénalidomide, nous avons comparé les taux plasmatiques de CXCL12 avant mise sous traitement et à l'arrêt du traitement. Nous avons ainsi observé, de façon inattendue, une augmentation des taux plasmatiques de CXCL12 au cours du traitement, chez l'ensemble des patients évaluables. En revanche, aucune différence n'a été observée entre les patients ayant progressé et ceux restés stables au cours de l'étude, quelque soit le score d'évaluation considéré (PGA ou ACTG). Ces données sont en défaveur d'un rôle de biomarqueur, témoin de la progression sous traitement, pour CXCL12. Nous ne pouvons conclure quant à l'évolution de CXCL12 en cas de réponse au traitement puisqu'aucun patient de l'essai n'a présenté de réponse complète ou partielle sous lénalidomide. De plus, en raison du faible nombre de patients inclus dans cette étude, nos résultats doivent être interprétés avec précautions.

Afin de compléter le profil d'expression cytokinique plasmatique des patients atteints de MK-VIH, nous avons mesuré par technique de microdosage multiplex révélée par électrochimioluminescence, un grand nombre de facteurs solubles, à savoir, l'IFN-γ, le TNF-α, le VEGF-A, l'IL-1β, l'IL-4, l'IL-6, l'IL-8, l'IL-10, l'IL-12p70 et l'IL-17A, avant que les patients ne soient mis sous lénalidomide. Ces profils ont été comparés à ceux des volontaires sains et des patients VIH sans MK. Les résultats de microdosages ont mis en évidence une augmentation des taux plasmatiques d'IL-6 et d'IL-10 et dans une moindre mesure de TNF-α et d'IFN-γ chez les patients de l'essai. Ces différences étaient communes aux patients infectés par le VIH pour le TNF- α et l'IL-6 et spécifiques à la MK-VIH pour l'IFN- γ et l'IL-10, témoignant respectivement d'un état inflammatoire chronique chez les patients infectés par le VIH et d'une modulation de la réponse immunitaire chez les patients développant une MK.

En conclusion, cette étude nous a permis de mettre en évidence l'augmentation de la détection du trio CXCL12/CXCR4-CXCR7 dans les lésions de MK, avec de possibles effets autocrines et paracrines impliqués dans la prolifération cellulaire, la propagation tissulaire du virus et l'angiogenèse. A notre connaissance, cette étude suggère pour la première fois le rôle de biomarqueur tissulaire, témoin du processus physiopathologique de la MK, pour le trio CXCL12/CXCR4-CXCR7. En revanche, CXCL12 ne semble pas être un biomarqueur plasmatique à la fois de la physiopathologie ou de la progression de la MK. Enfin, cette étude

confirme l'état pro-inflammatoire des patients infectés par le VIH et rapporte une immunomodulation particulière chez les patients MK-VIH, peut-être à l'origine du développement et de la progression de la maladie. Néanmoins, des études complémentaires sont nécessaires afin d'évaluer l'évolution de ces marqueurs en cas de réponse au lénalidomide, ou à une autre stratégie thérapeutique mise en place dans la MK.

Discussion et Perspectives

« L'ignorant affirme, le savant doute, le sage réfléchit »

Aristote

Durant ce travail, nous avons étudié **l'impact clinique et immunologique d'un traitement par lénalidomide dans la MK-VIH.** En confrontant nos résultats aux données de la littérature, nous évaluerons l'**efficacité** et la **tolérance** au lénalidomide dans cette indication, nous discuterons de l'**absence d'interaction** entre cette molécule et les ARV, mais aussi du **choix de la dose** et du mode **d'évaluation de la réponse** au traitement dans la MK. A la lumière de nos résultats, nous caractériserons le rôle de **biomarqueur** du trio de chimiokine et récepteurs **CXCL12/CXCR4-CXCR7**, dans la MK. Enfin, nous tenterons de mettre en perspective l'apport de nos travaux dans la compréhension de **l'impact des cytokines et facteurs de croissance** dans les mécanismes physiopathologiques de la MK-VIH.

1) Impact d'un traitement par lénalidomide dans la MK-VIH

A. Réponse et tolérance des patients atteints de MK-VIH au lénalidomide

1) Un réponse clinique faible

Dans le cadre de l'essai clinique ANRS 154 Lenakap, nous avons observé selon les critères ACTG, une réponse partielle pour 1 patient à S24 et pour 4 patients à S48, en revanche aucune réponse, même partielle, n'a été rapportée selon les critères PGA. Globalement, le taux de réponse observé selon les critères ACTG, était inférieur à celui retrouvé avec les principales chimiothérapies conventionnelles, telles que la vincristine (61%), la bléomycine (48%) ou la doxorubicine-pegylée (59%) (404, 407, 542), mais était comparable à celui observé avec les nouveaux traitements immunomodulateurs ou anti-angiogéniques testés, tels le bevacizumab (31%), le COL-3 (29 à 41%), l'imatinib (33%) ou le thalidomide (34 à 47%) (444, 452, 466, 500, 501).

Bien qu'aucune réponse complète n'ait été retrouvée, quel que soit le critère utilisé, la survie sans progression à S48, sous lénalidomide était de 64%, avec une médiane de plus de 12 mois sans progression, supérieure à celles retrouvées avec le bévacizumab (8,3 mois), l'imatinib (5,2 mois), la vincristine ou la bléomycine (<4 mois). Cette absence de progression est encourageante puisque les patients inclus dans notre essai présentaient une forme de MK-VIH résistante à plusieurs lignes de chimiothérapies antérieures. De plus, ces patients avaient tous précédemment progressé, malgré un traitement ARV efficace (CV VIH<50 copies/ml), un taux de CD4 relativement élevé (médiane de 444/mm^3 à l'inclusion) et avaient tous

présenté des échecs à une ou plusieurs lignes de chimiothérapies antérieures (médiane de 6 lignes).

2) Le choix de la dose était-il optimal ?

Le taux de réponse plutôt faible retrouvé dans le cadre de cet essai ne semble pas lié à un problème d'observance des patients. En effet, cette dernière était bonne ou très bonne chez la plupart des patients. Un seul d'entre eux a présenté une consommation inférieure à 90% des gélules à S24. Chez ce dernier un problème d'observance est suspecté comme en atteste le rebond de CV VIH observé à S4 et des concentrations plasmatiques résiduelles d'ARV indétectables à S12.

Le taux de réponse pourrait en revanche s'expliquer par un choix de dose de lénalidomide inadaptée à la prise en charge de la MK. En effet, en l'absence d'essai d'escalade de doses préexistant, qui aurait permis de déterminer la dose optimale dans cette pathologie, la posologie choisie a été de 25mg/j, celle utilisée dans la plupart des cancers, tels le myélome multiple, les lymphomes malins non Hodgkiniens, le cancer du pancréas, du rein ou encore de la prostate (474, 543-547). Aux vues de la bonne tolérance rapportée dans notre étude, une augmentation des doses de lénalidomide aurait peut-être permis d'obtenir un meilleur taux de réponse. En effet, dans différents cancers, des doses de lénalidomide supérieures à 25 mg/j ont été testées, avec des tolérances globalement bonnes (548-551). Dans le mélanome métastatique par exemple, des doses de 50 mg/j ont été administrée chez 10 patients ayant présenté une stabilité de la maladie et une bonne qualité de vie (551). Un essai clinique de phase I-II, testant le lénalidomide dans la MK-VIH est actuellement mené aux Etats-Unis, par le NCI. Ce dernier comporte une phase d'escalade de dose, afin de déterminer la dose maximale tolérée et la dose optimale. Cette étude devrait donc apporter de nouvelles données dans cette indication, notamment en terme de dose cible (552).

3) Une bonne tolérance au lénalidomide dans la MK-VIH

La tolérance clinique et biologique des patients au cours de l'essai a été bonne. L'incidence faible et le type d'effets indésirables rapportés, correspondaient à ceux observés dans la plupart des essais cliniques menés avec le lénalidomide. Ils incluaient des exanthèmes, neurotoxicité, myélosuppression, se manifestant principalement par des neutropénies, thrombocytopénies, leucopénies ou anémies, des événements thromboemboliques ou des effets plus bénins, telles des asthénies, nausées et vomissements, céphalées, etc. (553-556).

Au niveau biologique, nous n'avons observé aucune modification des taux moyens de lymphocytes T CD4, CD8, du ratio CD4/CD8, des taux d'hémoglobine, des clairances de la

créatinine ou encore des taux de plaquettes, contrairement aux taux de leucocytes et de polynucléaires neutrophiles, qui ont significativement diminué.

Au cours des 101 cycles de cet essai, seuls 14 effets indésirables de grade 3 ou 4, au moins susceptibles d'être liés au lénalidomide, soit 1 pour 12 cycles, ont été rapportés. Les effets indésirables les plus fréquemment observés étaient les neutropénies, thrombopénies et asthénie, tandis qu'aucune neurotoxicité ou accident thromboembolique n'a été rapporté. Deux patients ont reçu des facteurs de croissance hématopoïétiques et un patient a bénéficié d'une adaptation de dose suite à un exanthème.

La tolérance rapportée au cours de notre étude est globalement meilleure que celle observée avec les chimiothérapies conventionnelles. En effet, avec des molécules telles que l'IFN-α, la bléomycine, la vinblastine, la doxorubicine, la daunorubicine, le docetaxel ou encore le paclitaxel, les cas de myélosuppression, neurotoxicité, fièvre, cytolyse hépatique, nausées, vomissements, diarrhées et réactions d'hypersensibilité surviennent chez plus de 30 % des patients et nécessitent fréquemment des adaptations de doses ou des arrêts de traitement (2, 352, 526). Elle est également meilleure que celle observée avec l'imatinib, avec 70% des patients ayant présenté des effets indésirables, ayant conduit à l'arrêt du traitement chez 16% d'entre eux (466).

4) Pas d'interaction entre le lénalidomide et les ARV

La prise en charge par chimiothérapies cytotoxiques des patients recevant des ARV est difficile en raison des interactions médicamenteuses potentielles (369, 557). Contrairement à la plupart des chimiothérapies utilisées dans la MK, notre étude suggère l'absence d'interaction entre le lénalidomide et les ARV (369, 415-417, 423-425). Les données obtenues jusque-là sur des cas isolés de patients étaient contradictoires, avec des interactions possibles entre les inhibiteurs des Pgp et le lénalidomide, lui-même substrat faible des Pgp (509-512, 558). Dans notre étude pharmacocinétique, aucune accumulation de lénalidomide n'a été observée chez les patients, y compris ceux recevant des inhibiteurs des Pgp, tels que le ritonavir. Le lénalidomide n'étant ni inducteur, ni inhibiteur des CYP 450 et des Pgp, il n'était pas attendu d'interaction vis-à-vis des ARV (558, 559). Cela a été confirmé par notre étude, puisque les concentrations plasmatiques des ARV sont restées majoritairement stables et efficaces.

Nos résultats ne permettent pas d'exclure la présence d'interactions avec des inducteurs enzymatiques des Pgp. En effet, nos analyses ont été effectuées sur des prélèvements mensuels uniques et non multiples, qui auraient permis une étude de la

concentration maximale, de l'aire sous la courbe des concentrations en fonction du temps et de la demi-vie du lénalidomide. Cependant, une interaction entre ces composés est peu probable. En effet, nous savons que le lénalidomide est un substrat faible des Pgp, présentant une affinité faible pour cette protéine et un ratio d'efflux bas (Constante de Michaelis élevée : 802 µM et ratio faible compris entre 1,9 et 3) (509, 558). De plus, le lénalidomide est fréquemment utilisé en combinaison avec la dexaméthasone, une molécule inductrice des Pgp, notamment dans le myélome multiple (560, 561). Or, aucune modification des concentrations plasmatiques de lénalidomide n'a été observée suite à l'ajout de dexaméthasone dans cette indication (550).

Les données pharmacocinétiques obtenues au cours de notre étude suggèrent l'absence d'interaction entre le lénalidomide et les ARV. Ces éléments cumulés à la bonne tolérance des patients traités par ARV sont en faveur d'une utilisation du lénalidomide chez les patients VIH, notamment dans d'autres indications, tels que le myélome multiple ou les syndromes myélodysplasiques (332, 562, 563).

B. **Comment évaluer la réponse au traitement dans la MK ?**

Comme nous l'avons vu précédemment, nous avons été confronté à une discordance dans l'évaluation de la réponse au traitement, entre les scores PGA et ACTG, mais aussi entre les groupes d'évaluateurs eux-mêmes. Ces disparités témoignent de la complexité de l'évaluation de la MK, comme mis en évidence par différents auteurs (370, 564). Deux principales hypothèses peuvent expliquer la discordance observée entre les 2 scores : i) le score PGA n'était pas le critère idéal pour apprécier l'efficacité d'un traitement dans la MK, ii) les lésions index étudiées et les photographies ne permettaient pas d'observer la régression de la pathologie selon ce score.

La standardisation des méthodes d'évaluation de la réponse aux traitements dans la MK reste problématique. En effet, la plupart des essais cliniques se basent sur les critères ACTG, pour évaluer cette réponse et ce depuis la période pré-ARV (370). Ces critères exigent une évaluation détaillée de multiples lésions, avec une forte variabilité interindividuelle (564). De plus, elle ne permet pas d'évaluer la présence et l'évolution de lésions internes, notamment viscérales (565, 566). Dans l'essai ANRS 154 Lenakap, nous avons choisi un critère composite pour évaluer la réponse au lénalidomide. Ce dernier reposait sur l'utilisation d'un score PGA à 7 points, allant d'absence totale à aggravation des symptômes, évalué à la fois par l'investigateur, le patient et un comité de validation, sur photographies. Ce score, simple d'application est fréquemment utilisé en dermatologie et se base sur l'analyse de

l'érythème, des desquamations et de l'induration pour évaluer les traitements, notamment dans le psoriasis ou les lymphomes cutanés (567). Cependant, d'après nos résultats, ce critère ne semble pas transposable à la MK.

Par ailleurs, une discordance entre les groupes d'évaluateurs a été retrouvée au cours de l'étude. Selon les investigateurs et patients, 3 malades montraient une réponse partielle à S48, tandis que le comité de validation considérait la maladie comme stable, selon le score PGA. Ces différences pourraient s'expliquer par une difficulté à évaluer, *a posteriori,* les photographies des patients, notamment en raison de la qualité insuffisante de certaines d'entre elles, comme indiqué par le comité indépendant dans son avis du 24 Avril 2013. En effet, malgré une standardisation de la procédure de prise, certains éclairages ne permettaient pas d'évaluer correctement la nodularité et l'infiltration des lésions, souvent plus informative que la taille en elle-même (568). Le comité indépendant a par ailleurs indiqué qu'il n'était pas possible de statuer sur l'efficacité du traitement, en raison de la nature des lésions cibles choisies. Un grand nombre de lésions index sélectionnées par les investigateurs, correspondaient à des lésions maculaires et papulaires, rendant l'évaluation de l'infiltration et de l'évolution de ces dernières plus complexes. Enfin, l'hyperpigmentation résiduelle, liée à la présence d'hémosidérine au niveau de certaines lésions, même après régression a pu compromettre l'évaluation des photographies. Une biopsie de peau après traitement aurait pu être utile afin de différencier les zones hyperpigmentées, de lésions résiduelles, comme proposé par O'Mahony et coll. (568).

Les 4 cas précédemment rapportés de MK-VIH traités par lénalidomide, avaient été évalués à l'aide des critères ACTG, en association un TEP (tomographie par émission de positons) scan (498, 499). Dans notre étude, les critères ACTG ont permis d'objectiver 4 réponses partielles à S48, mais le TEP scan n'avait pas été retenu comme critères en l'absence de financement. Bien que ce second score soit plus contraignant pour l'évaluation des lésions que le score PGA, il semble qu'il reste plus spécifique dans la MK. Sa combinaison à d'autres moyens d'évaluation, tel que le TEP scan, notamment pour l'évaluation des lésions viscérales, semble à privilégier dans cette pathologie (565, 566, 569).

C. **Perspectives pour les dérivés du thalidomide dans la MK**

Compte tenu de problèmes techniques dans l'évaluation de la réponse au traitement, le comité indépendant a émis l'avis d'interrompre les inclusions dans l'essai clinique, après que 12 patients aient été inscrits. Malgré une interprétation difficile de la réponse au traitement, considérant la facilité d'administration du lénalidomide, sa bonne tolérance chez les patients

infectés par le VIH, son absence d'interaction avec les ARV et la longue survie sans progression rapportée chez ces patients à haut risque de progression, l'intérêt potentiel du lénalidomide dans la MK-VIH justifie selon le comité de poursuivre l'évaluation de ce traitement dans cette indication, dans le cadre d'études de phase II, après révision des critères d'inclusion et de jugement, plus ou moins associés à un TEP scan. Les résultats de l'essai clinique de phase I-II du NCI, incluant une escalade de dose, toujours en attente, cumulés à ceux de Lenakap devraient compléter l'évaluation globale du lénalidomide dans cette indication.

Le recours au pomalidomide, un dérivé du thalidomide, autorisé depuis 2013 en Europe et aux Etats-Unis, dans la prise en charge du myélome multiple, pourrait être prometteur. Cette molécule présente des propriétés antitumorales, immunomodulatrices et anti-angiogéniques supérieures à celles du thalidomide et du lénalidomide et un profil de tolérance amélioré (493, 570). Les résultats obtenus avec le lénalidomide dans notre étude, mais aussi précédemment avec le thalidomide, rendent pertinente l'évaluation de cette nouvelle molécule dans la MK-VIH. Les résultats préliminaires d'une étude prospective de phase I/II menée par le NCI et le NIH, testant l'efficacité et la sécurité d'utilisation du pomalidomide dans la MK liée ou non au VIH, ont été présentés à la 22ème C*onference on Retrovirus and Opportunistic Infections* en 2015 (507). Ces derniers portaient sur l'évaluation de 22 hommes, âgés de 52 ans (bornes 32-74), 15 (68%) infectés par VIH, 7 (32%) non infectés, 19 prétraités (86 %) et 17 (77 %) à un stade avancé de MK (stade T1). Les patients VIH présentaient un taux médian de CD4 de 378/mm^3 (135-732), une CV VIH < 50 copies/ml et étaient traités par ARV depuis 48 mois en médiane (7-227). Le traitement consistait en l'administration par voie orale de 5 mg de pomalidomide par jour, 21 jours sur 28, en association à de l'aspirine faible dose. Une réduction de dose à 3 mg par jour était prévue en cas d'intolérance. Quatre (18%) des patients ont présentés une réponse complète, 12 (55%) une réponse partielle, 3 (13,5%) une stabilité et 3 (13,5%) une progression de la maladie au cours de l'essai. Le délai médian de réponse était de 4 semaines (4-36) (8 semaines chez les patients VIH, 4 semaines chez les patients non infectés par le VIH). La tolérance au traitement rapportée était globalement bonne, aucune réduction de dose n'ayant été nécessaire. Les effets indésirables de grade 3 ou 4 comprenaient uniquement des neutropénies (23 cycles, 10 patients), les autres effets indésirables de grade 1 ou 2 étaient principalement des lymphopénies T CD4, un œdème périphérique, des anémies, constipation, exanthème et asthénie. Les données pharmacocinétiques obtenues ne montraient pas d'accumulation de pomalidomide, quelque soit le statut VIH ou la combinaison ARV. Globalement, ces premiers

résultats suggèrent un traitement rapidement efficace, bien toléré et ne présentant pas d'interaction avec les ARV. Ces résultats très encourageants, sont à confirmer. En effet, de part le métabolisme du pomalidomide par le CYP 1A2 et 3A4 et son statut de substrat des Pgp, des interactions sont possibles notamment avec les inhibiteurs du CYP 1A2 (514). D'autre part, d'un point de vue pharmaco-économique, le surcoût engendré par la prise de pomalidomide, implique de confirmer sa supériorité par rapport au lénalidomide, voire de stratifier les lignes thérapeutiques, comme cela est fait dans le myélome multiple.

2) Nouvelles données dans la physiopathologie de la MK

A. CXCL12/CXCR4-CXCR7 biomarqueurs histologiques de la MK

Selon la définition du NIH, un biomarqueur est une caractéristique qui est objectivement mesurée et évaluée comme un indicateur de processus biologiques normaux ou pathologiques, ou de réponses pharmacologiques à une intervention thérapeutique (571). On distingue les biomarqueurs de type 0 : témoins de l'histoire naturelle de la maladie, devant correspondre au fil du temps aux indicateurs cliniques connus. Les biomarqueurs de type 1 : témoins de l'efficacité d'interventions thérapeutiques et les biomarqueurs de type 2 ou biomarqueurs de substitution : destinés à se substituer à un critère d'évaluation clinique (571, 572).

Dans la MK, seuls quelques biomarqueurs ont été identifiés. Par exemple, la détection de LANA dans les lésions cutanées ou viscérales de MK permet de les distinguer d'autres pathologies, tels que l'angiosarcome cutané, certains mélanomes ou le granulome pyogénique (573). La détection immunohistochimique de la protéine LANA constitue une méthode fiable et rentable de diagnostic de la MK (538, 574, 575). D'autres marqueurs tels que D2-40, CD31 ou CD34 sont également utiles pour le diagnostic de la MK, mais ne sont pas pathognomoniques de la maladie (576). D'autres marquages immunohistochimiques de protéines virales impliquées dans le processus tumoral sont également disponibles : vIL-6, vFLIP ou encore la vCycline, mais ne sont pas systématiquement retrouvés dans les lésions (577-579). En revanche, il n'existe pas à notre connaissance de biomarqueur spécifique, tissulaire et/ou soluble, témoin ou prédictif de la réponse à un traitement dans cette indication.

1) CXCL12/CXCR4-CXCR7, un trio impliqué dans la physiopathologie de la MK

Dans le cadre de la seconde étude, nous avons exploré l'implication de l'axe CXCL12/CXCR4-CXCR7 dans la physiopathologie de la MK et l'éventuel rôle de biomarqueur de ce trio. Nos travaux démontrent pour la première fois, *in vivo*, l'augmentation concomitante de la détection des protéines du trio CXCL12/CXCR4-CXCR7 dans les lésions cutanées de MK-VIH et de MK-classique. L'augmentation observée de CXCL12 au sein des lésions de MK est en accord avec les résultats publiés par Pablos et coll. et Yao et coll. (254, 255). Ceux-ci avaient rapporté respectivement une expression constitutive de CXCL12 par les cellules endothéliales et dendritiques de la peau et une forte détection de cette protéine dans une lésion de MK-VIH. L'augmentation de CXCR4, quant à elle est en accord avec la forte détection rapportée par Uccini et coll. sur 6 lésions nodulaires de MK-classique (284) et s'avère cohérente avec la surexpression du gène *CXCR4* observée dans 6 lésions de MK (182). Nos résultats en revanche, diffèrent de ceux rapportés par Yao et coll. à partir d'une lésion de MK-VIH et de ceux rapporté par Punj et coll., *in vitro,* suite à l'infection d'HUVEC par HHV-8, montrant une diminution de l'expression de *CXCR4* (255, 285). Enfin, l'augmentation de CXCR7 que nous avons observée est en accord avec les résultats de 3 études différentes, rapportant une surexpression du gène *CXCR7*, à la fois *in vitro,* suite à l'infection de DMVEC par HHV-8 et *in situ*, dans deux lésions de MK-VIH (103, 104, 304). Nos résultats étaient indépendants de la forme clinique de Kaposi, suggérant un rôle dans la physiopathologie de la MK, non lié à la présence du VIH.

Par ailleurs, la détection du trio était considérablement augmentée dans les lésions nodulaires de MK par rapport aux lésions maculaires et papulaires, indiquant une corrélation entre la présence des protéines du trio et le stade des lésions de MK. Ces résultats peuvent justifier les disparités observées entre les études relatives à la présence de CXCR4, puisque le stade des lésions, non spécifié dans tous les cas, peut influencer la détection protéique. Ces résultats valident l'implication des protéines du trio CXCL12/CXCR4-CXCR7 dans la physiopathologie de la MK et sont en faveur d'un rôle de biomarqueur histologique de type 0, témoin de l'histoire naturelle de la maladie.

2) CXCL12/CXCR4-CXCR7 biomarqueurs histologiques de la MK

Afin d'établir le rôle potentiel de biomarqueur de type 0, nous avons du confirmer que le trio correspondait au fil du temps à des indicateurs de la MK. Ainsi, nous avons choisi

d'étudier les marqueurs LANA, Ki67 et VEGF. Comme nous l'avons déjà précisé, LANA est un biomarqueur diagnostique de la MK et est étroitement corrélée à la progression de la maladie. Sa détection est augmentée dans les lésions nodulaires de MK par rapport aux lésions papulaires et maculaires, mais aussi dans les lésions viscérales par rapport à la muqueuse superficielle des patients (538). Notre étude confirme ces résultats, mais aussi la co-détection des protéines CXCL12 et LANA, comme précédemment rapportée par Yao et coll. (255). Nous avons étendu cette notion à CXCR4 et CXCR7 et montré une corrélation positive entre le pourcentage de cellules endothéliales et SC exprimant CXCL12, CXCR4, CXCR7 et LANA, suggérant une interaction entre le virus HHV-8 et le trio, dans la physiopathologie de la MK. Par exemple, CXCL12 pourrait promouvoir le recrutement d'HHV-8 via la génération d'un gradient de concentration, induisant la migration trans-endothéliale de cellules $CXCR4^+$, tels que les lymphocytes, connus pour être des cellules cibles d'HHV-8 (255, 308). Le co-marquage nucléaire retrouvé entre CXCR4 et LANA est également intéressant. Il est en accord avec la séquence d'adressage au noyau identifié au sein de la protéine CXCR4, permettant après interaction avec la transportin β1 de rejoindre le noyau tout en restant fonctionnelle, comme en atteste la mobilisation de calcium et la diminution de l'expression de la protéine $G_{\alpha i}$ observées dans les noyaux concernés (580, 581). Par ailleurs, nous savons que CXCR4 est capable d'interagir avec de multiples protéines virales, appartenant notamment au VIH, à HSV ou à HHV-8 (582-584). De la même façon, LANA présente une séquence d'adressage au noyau et interagit avec de multiples protéines cellulaires et virales (113, 585). Elle est également capable de promouvoir l'accumulation intranucléaire du facteur HIF-1, connu pour promouvoir l'expression de *CXCL12, CXCR4* et *CXCR7* (194, 586, 587). Enfin, la co-détection de LANA et CXCR7 est également compatible avec une collaboration entre les 2 protagonistes, comme suggéré par la forte induction de *CXCR7* par HHV-8, aboutissant à la foci formation et jouant un rôle direct dans la tumorigénèse chez les souris *nude* (104). Globalement, les résultats obtenus dans notre étude sont en faveur de liens étroits entre les protéines du trio et LANA, de nouvelles études, notamment *in vitro* nous semblent nécessaires afin d'étudier les mécanismes intracellulaires induit ou à l'origine de ces interactions.

Comme nous l'avons vu, la MK fait intervenir différents processus pathologiques, dont la prolifération (affectant principalement les SC) et l'angiogenèse. Une augmentation du taux de prolifération en fonction du stade de MK a été rapportée par Hodak et coll. et Haupt et coll. (588, 589). La corrélation retrouvée dans notre analyse entre le pourcentage de cellules cibles en prolifération et $LANA^+$ est en accord avec des résultats précédemment publiés par

Pyakurel et coll., montrant que la plupart des cellules $Ki67^+$ sont également $LANA^+$ (590). Elle est également en accord avec ceux de Lu et coll., qui suggèrent que LANA puisse induire l'expression de la survivin et ainsi promouvoir la prolifération cellulaire (591). Notre travail indique par ailleurs que la plupart des cellules en prolifération sont co-marquées par CXCL12, CXCR4 et CXCR7, évoquant un effet autocrine et paracrine du trio sur la multiplication des cellules. Le rôle du trio dans la prolifération cellulaire de différents cancers est bien connu, notamment via l'activation des voies PI3K/Akt/MAPK (214). Il semble également intervenir dans la MK, comme confirmé par les corrélations positives entre le pourcentage de cellules cibles en prolifération et positives pour CXCL12, CXCR4 et CXCR7, retrouvées dans nos travaux. Ceci demande également à être exploré dans la MK, dans de futures études.

Enfin, nous avons analysé le lien entre le facteur pro-angiogénique VEGF et le trio dans la MK. Ce facteur, connu pour être induit par les cytokines pro-inflammatoires, coopère avec certaines d'entre elles dans la MK, pour réguler l'angiogenèse et la perméabilité vasculaire (541, 592, 593). A notre connaissance, aucune étude préexistante n'a analysé la présence du VEGF en fonction du stade des lésions de MK. L'augmentation de la détection de VEGF dans les lésions de MK par rapport aux lésions d'angiomes et dans les lésions nodulaires par rapport aux lésions maculaires et papulaires est en accord avec la forte détection de VEGF *in vivo* au niveau des SC et avec l'effet autocrine et paracrine du VEGF sur la croissance des SC (592, 594). Les corrélations positives retrouvées entre le pourcentage de cellules positives pour VEGF et pour LANA et Ki67 concordent avec l'amélioration de l'infection des cellules cibles par HHV-8 induite par VEGF et avec son effet mitogène sur les cellules endothéliales (541, 592, 595). Des corrélations entre CXCR4, CXCR7 et VEGF ont été rapportées dans différents cancers, tels que le cancer du sein, le rhabdomyosarcome ou le carcinome hépatocellulaire (596-598), CXCR4 pouvant notamment promouvoir l'expression du VEGF via l'activation d'Akt (597) et CXCR7 pouvant induire l'expression et la sécrétion de VEGF, elle-même à l'origine d'un rétrocontrôle positif sur l'expression de CXCR7 (598, 599). La corrélation positive observée avec CXCR4 et CXCR7 dans notre étude est donc en accord avec ces liens décrits en cancérologie. Nous avons observé une tendance avec CXCL12, mais la corrélation avec VEGF ne s'est pas révélée statistiquement significative. Ceci peut s'expliquer par un nombre d'échantillons insuffisant, ou par des effets pro-angiogénique de VEGF et CXCL12 indépendants l'un de l'autre (600). La encore des études in vitro, nous semblent nécessaires afin d'analyser les liens entre angiogénèse et protéines du trio dans cette pathologie.

Nous avons donc mis en évidence que le trio CXCL12/CXCR4-CXCR7 était un témoin de l'histoire naturelle de la maladie, avec une détection comparable dans les formes MK-VIH et MK-classique, mais augmentée dans les lésions avancées. Nous avons également confirmé que la détection des protéines correspondait au fil du temps à la sévérité des lésions mais aussi à celles de LANA, Ki67 et VEGF, des indicateurs physiopathologiques connus de la MK. Ces résultats sont donc compatibles avec le rôle de biomarqueur histologique de type 0 pour CXCL12 et ses récepteurs dans cette pathologie et devrait être validé sur une cohorte plus large.

3) CXCL12 n'est pas un biomarqueur plasmatique de la MK ?

Dans notre étude, nous n'avons pas mis en évidence de différence dans les taux plasmatiques de CXCL12 chez les patients de l'essai avant mise sous lénalidomide et ceux de volontaires sains ou de patients VIH sans MK. Au moins trois hypothèses peuvent justifier cette absence de différence entre les groupes étudiés : i) les taux plasmatiques de CXCL12 chez les patients MK-VIH ne reflètent pas la présence de cette chimiokine au niveau des lésions, ii) le test ELISA de mesure de CXCL12 ne permet pas de doser des variants de la chimiokine ayant subit des protéolyses N- ou C-terminales, iii) la taille de l'échantillon étudié ne permet pas de mettre en évidence de différence entre les groupes.

La première hypothèse serait que les taux plasmatiques de CXCL12 chez les patients inclus dans l'essai clinique ne diffèrent pas de ceux des patients infectés par le VIH ou des donneurs sains et ne reflètent pas sa présence *in situ* au sein des lésions de MK. Nous savons que la protéine CXCL12 est capable de se lier aux héparanes sulfates qui tapissent la membrane des cellules productrices et certains composants de la matrice extracellulaire. Cette fixation de haute affinité assure une concentration de la chimiokine au niveau des sites spécifiques et favorise sa présentation aux récepteurs (198, 199). Bien que CXCL12 soit détectable dans le sang de volontaires sains ou de patients infectés par le VIH, sa demi-vie plasmatique est très courte, la protéine subissant différents clivages protéolytiques à la fois au niveau N- et C-terminal (197, 200). L'absence de différence observée entre les patients VIH sans MK et les volontaires sains, rapportée dans notre étude est en accord avec les résultats précédemment publiés par Villalba et coll. (601). Dans la MK-VIH, une protéolyse exacerbée pourrait expliquer l'absence de différence avec les patients VIH sans MK ou avec les volontaires sains. En effet, comme nous l'avons vu plus tôt, l'expression de certaines MMP est renforcée dans cette pathologie, c'est notamment le cas des MMP-1, -2, -3, -7, -9 et -13 (447, 448). Or, certaines de ces MMP, peuvent induire un clivage de CXCL12 (602). Cette

hypothèse demande à être explorée, notamment *in vitro*, par mesure de l'activité protéolytique plasmatique des patients MK-VIH. Ce résultat pourrait également être lié à une absence de détection, avec le kit ELISA utilisé, de certaines formes clivées de CXCL12 qui pourraient exister dans la MK-VIH. L'anticorps fournit dans le kit ELISA de R&D System® reconnaît un épitope compris entre les Lysine 22 et 68 de la protéine, on ne peut exclure une augmentation d'un variant de protéolyse non détectable par le kit. Cette hypothèse demande à être étudiée de façon plus approfondie, par exemple en procédant à des Western blot, qui permettraient de détecter des variations de poids moléculaires, en utilisant d'autres anticorps anti-CXCL12 ou par spectrométrie de masse (198).

Enfin, nous ne pouvons écarter la possibilité que le faible nombre d'échantillons disponibles dans cette étude n'ait pu permettre de détecter une différence. Nous ne pouvons donc conclure quant à un rôle de biomarqueur plasmatique de type 0 pour CXCL12. Nous n'avons par ailleurs, pas retrouvé de différence dans l'évolution des taux plasmatiques de CXCL12 au cours du traitement par lénalidomide entre les patients progresseurs et non progresseurs, quel que soit le score d'évaluation utilisé. Les taux plasmatiques de CXCL12 à l'inclusion n'étaient pas non plus prédictifs d'une évolution de la surface des lésions sous lénalidomide. Ces résultats sont en défaveur d'un rôle de biomarqueur de type 1, témoin de l'efficacité de l'intervention thérapeutique. Cependant, il est intéressant de noter que dans le cadre de l'essai ANRS 154 Lenakap, aucun patient n'a présenté de réponse complète au traitement. Nous ne pouvons donc conclure formellement, quant à l'évolution de CXCL12 en cas de réponse au traitement. De plus, l'augmentation des taux de CXCL12 observée au cours de l'étude est peut-être le reflet d'une progression de la maladie. Des analyses complémentaires, dans le cadre d'essais cliniques menés dans la MK, semblent utiles afin d'analyser le profil d'évolution de CXCL12 chez des patients présentant une réponse en comparaison à ceux progressant, afin de conclure sur le rôle de biomarqueur plasmatique de CXCL12. De façon intéressante, les variations de concentrations de CXCL12 observées chez les patients corrèlent positivement à celles de VEGF-A, en accord avec la collaboration des 2 facteurs dans la MK-VIH.

4) Une signature cytokinique spécifique de la MK-VIH

Notre étude rapporte pour la première fois une analyse simultanée des concentrations plasmatiques d'un large panel de cytokines et facteurs de croissance, chez des patients atteints de MK-VIH, en comparaison à celles observées chez des donneurs sains et des patients VIH sans MK. Cette analyse a permis de distinguer 4 facteurs solubles impliqués dans l'infection

par le VIH et/ou la MK-VIH. Nous avons tout d'abord rapporté une augmentation de la concentration d'IL-6 à la fois chez les patients VIH sans MK et MK-VIH, confirmant l'état inflammatoire rencontré chez ces patients, y compris en cas de traitement ARV efficace, comme publié précédemment par différentes équipes (172, 603). Nous avons également observé une augmentation des concentrations de TNF-α chez les patients MK-VIH par rapport aux donneurs sains. Ceci pourrait notamment s'expliquer par l'effet du virus HHV-8 sur la sécrétion de TNF-α par les lymphocytes B (172). Cela corrobore également avec l'augmentation des concentrations sériques de TNF-α observée par Knowlton et coll. chez les patients MK-VIH, mais aussi chez les patients infectés par HHV-8 et par le VIH dans l'année précédant l'apparition de la MK, non retrouvée chez ceux ne développant pas la maladie (172). Dans notre cas, nous n'avons pas observé de différence entre les patients VIH sans MK, quel que soit leur statut sérologiques vis-à-vis d'HHV-8 (4 patient HHV-8 positifs et 8 patients HHV-8 négatifs). Ce résultat peut s'expliquer par le faible effectif dans chaque groupe. D'autre part, les patients infectés par HHV-8 de notre cohorte n'avaient peut-être pas le même profil que celui des patients inclus dans l'étude de Knowlton et coll.

Deux autres paramètres se sont montrés spécifiques de la MK-VIH : l'IFN-γ et l'IL-10, augmentés uniquement chez les patients de l'essai. Il a été montré que l'IFN-γ était produit par les CMSP de patients atteints de MK, pouvant expliquer nos résultats (170). Par ailleurs, Machado et coll. ont rapporté une production d'IL-10 accrue chez les patients MK-VIH, par rapport aux patients MK-classique et VIH sans MK, notamment dans les formes disséminées, confortant là encore nos analyses (604). L'IL-10 est une cytokine pléïotrope produite par un grand nombre de cellules dont les lymphocytes Th2, T régulateurs (Treg), et les lymphocytes B. Elle présente à la fois des propriétés anti-inflammatoires, notamment par inhibition de la production de certaines cytokines pro-inflammatoires : IL-2, TNF-α, INF-γ, *etc.*, en favorisant la production de lymphocytes T régulateurs Tr1, ou encore en inhibant les propriétés des cellules présentatrices d'antigènes, mais elle possède également des propriétés pro-inflammatoires, notamment par stimulation de la prolifération de lymphocytes B, l'activation des cellules NK et l'amélioration de la survie des lymphocytes B et T (605). Différents virus, dont EBV, produisent un analogue de l'IL-10 humaine. Il est probable que l'IL-10 et ses homologues viraux jouent un rôle majeur dans la physiopathologie des infections virales, notamment en contribuant à l'échappement des virus à la réponse immunitaire de l'hôte et éventuellement la croissance de tumeurs viro-induites, comme cela a été mis en évidence pour l'IL-10 virale produite par EBV (605-607). La plus forte concentration d'IL-10, spécifiquement retrouvée chez les patients MK-VIH semble donc

également participer à la physiopathologie de ce cancer. Il est intéressant de noter que les patients ayant progressé au cours de l'essai sont ceux qui ont présenté une augmentation de l'IL-10 et de l'IFN-γ, non observée chez les patients stables. Il semble donc que ces facteurs contribuent à la progression de la MK, comme cela a été précédemment rapporté (170, 176-179). Il serait intéressant de confirmer ces résultats au niveau histologique, mais aussi d'étudier la contribution des lymphocytes Treg et Tr1 dans la MK.

En conclusion, la physiopathologie complexe de la MK, associant un microenvironnement riche en cytokines pro-inflammatoires, voire anti-inflammatoires et en facteurs pro-angiogéniques, suggère l'utilisation de molécules immunomodulatrices pléïotropes tels que les dérivés du thalidomide dans cette indication. Notre étude n'a pas permis de confirmer l'impact positif du lénalidomide dans cette indication. Une étude américaine est en cours dans cette même indication et devrait apporter des informations complémentaires. Le recours au pomalidomide, présentant notamment des propriétés anti-IL-6, anti-TNF-α et anti-VEGF semble prometteur. Ces molécules présentent des profils de tolérance favorable et un faible potentiel d'interactions médicamenteuses avec les ARV, justifiant la poursuite des investigations, notamment en étudiant l'impact de ces traitements dans d'autres formes de MK ou chez des patients à un stade plus précoce et moins sévère de MK. Ce travail rapporte pour la première fois le rôle de biomarqueur histologique du trio CXCL12/CXCR4-CXCR7 dans la MK. Des études *in vitro* et *in vivo* sont utiles afin de déterminer la coopération entre ces protéines et le virus HHV-8 ou encore avec les phénomènes de prolifération et d'angiogénèse. La signature cytokinique retrouvée dans le plasma des patients MK-VIH témoigne d'un état inflammatoire et d'une immunomodulation particulière. Nos expériences n'ont pas permis d'identifier de biomarqueur soluble pronostique de l'évolution ou de la réponse au traitement, mais la signature observée suggère le recours à une combinaison de plusieurs marqueurs, tels que le TNF-α, l'IFN-γ, l'IL-6, l'IL-10 et peut-être CXCL12 afin d'établir un « immunoscore » des patients, comme cela est déjà proposé dans certains cancers (608). Cette hypothèse devra être explorée sur une large cohorte de patients afin de proposer une nouvelle classification de ces derniers et éventuellement des thérapies personnalisées.

Références bibliographiques

« *L'important n'est pas de savoir lire mais de savoir ce qu'on lit, de raisonner sur ce qu'on lit, d'exercer un esprit critique sur la lecture. En dehors de cela, la lecture n'a aucun sens* »

Jacques Ellul

1. Lanoy E, Spano JP, Bonnet F, Guiguet M, Boue F, Cadranel J, et al. The spectrum of malignancies in HIV-infected patients in 2006 in France: the ONCOVIH study. Int J Cancer. 2011;129(2):467-75.
2. Hengge UR, Ruzicka T, Tyring SK, Stuschke M, Roggendorf M, Schwartz RA, et al. Update on Kaposi's sarcoma and other HHV8 associated diseases. Part 1: epidemiology, environmental predispositions, clinical manifestations, and therapy. Lancet Infect Dis. 2002;2(5):281-92.
3. Shortt J, Hsu AK, Johnstone RW. Thalidomide-analogue biology: immunological, molecular and epigenetic targets in cancer therapy. Oncogene. 2013;32(36):4191-202.
4. Gramolelli S, Schulz TF. The role of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus in the pathogenesis of Kaposi sarcoma. J Pathol. 2015;235(2):368-80.
5. Karamanou M, Antoniou C, Stratigos AJ, Saridaki Z, Androutsos G. The eminent dermatologist Moriz Kaposi (1837-1902) and the first description of idiopathic multiple pigmented sarcoma of the skin. J BUON. 2013;18(4):1101-5.
6. Centers for Disease C. Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men--New York City and California. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 1981;30(25):305-8.
7. Gottlieb GJ, Ragaz A, Vogel JV, Friedman-Kien A, Rywlin AM, Weiner EA, et al. A preliminary communication on extensively disseminated Kaposi's sarcoma in young homosexual men. Am J Dermatopathol. 1981;3(2):111-4.
8. Minhas V, Wood C. Epidemiology and transmission of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. Viruses. 2014;6(11):4178-94.
9. Hleyhel M, Belot A, Bouvier AM, Tattevin P, Pacanowski J, Genet P, et al. Trends in survival after cancer diagnosis among HIV-infected individuals between 1992 and 2009. Results from the FHDH-ANRS CO4 cohort. Int J Cancer. 2015:[Epub ahead of print].
10. Chang Y, Cesarman E, Pessin MS, Lee F, Culpepper J, Knowles DM, et al. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. Science. 1994;266(5192):1865-9.
11. Mesri EA, Cesarman E, Boshoff C. Kaposi's sarcoma and its associated herpesvirus. Nat Rev Cancer. 2010;10(10):707-19.
12. Antman K, Chang Y. Kaposi's sarcoma. N Engl J Med. 2000;342(14):1027-38.
13. Gessain A, Duprez R. Spindle cells and their role in Kaposi's sarcoma. Int J Biochem Cell Biol. 2005;37(12):2457-65.
14. Mohanna S, Maco V, Bravo F, Gotuzzo E. Epidemiology and clinical characteristics of classic Kaposi's sarcoma, seroprevalence, and variants of human herpesvirus 8 in South America: a critical review of an old disease. Int J Infect Dis. 2005;9(5):239-50.
15. Dedicoat M, Newton R. Review of the distribution of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) in Africa in relation to the incidence of Kaposi's sarcoma. Br J Cancer. 2003;88(1):1-3.
16. Pellett PE, Wright DJ, Engels EA, Ablashi DV, Dollard SC, Forghani B, et al. Multicenter comparison of serologic assays and estimation of human herpesvirus 8 seroprevalence among US blood donors. Transfusion. 2003;43(9):1260-8.
17. Whitby D, Luppi M, Barozzi P, Boshoff C, Weiss RA, Torelli G. Human herpesvirus 8 seroprevalence in blood donors and lymphoma patients from different regions of Italy. J Natl Cancer Inst. 1998;90(5):395-7.
18. Vitale F, Briffa DV, Whitby D, Maida I, Grochowska A, Levin A, et al. Kaposi's sarcoma herpes virus and Kaposi's sarcoma in the elderly populations of 3 Mediterranean islands. Int J Cancer. 2001;91(4):588-91.
19. Regamey N, Cathomas G, Schwager M, Wernli M, Harr T, Erb P. High human herpesvirus 8 seroprevalence in the homosexual population in Switzerland. J Clin Microbiol. 1998;36(6):1784-6.
20. Andreoni M, Sarmati L, Nicastri E, El Sawaf G, El Zalabani M, Uccella I, et al. Primary human herpesvirus 8 infection in immunocompetent children. JAMA. 2002;287(10):1295-300.
21. Butler LM, Were WA, Balinandi S, Downing R, Dollard S, Neilands TB, et al. Human herpesvirus 8 infection in children and adults in a population-based study in rural Uganda. J Infect Dis. 2011;203(5):625-34.
22. Martro E, Bulterys M, Stewart JA, Spira TJ, Cannon MJ, Thacher TD, et al. Comparison of human herpesvirus 8 and Epstein-Barr virus seropositivity among children in areas endemic and non-endemic for Kaposi's sarcoma. J Med Virol. 2004;72(1):126-31.
23. de Tejada BM, Steffen I, Cantero P, Posfay-Barbe KM, Irion O, Hirschel B, et al. Human herpes virus type 8 seroprevalence in pregnant women in Geneva, Switzerland. J Matern Fetal Neonatal Med. 2011;24(1):183-5.
24. Bohlius J, Maskew M, Davies MA, Egger M. HHV-8 seroprevalence in HIV-positive and HIV-negative populations. Int J Cancer. 2015;136(5):1243.
25. Janier M, Agbalika F, de La Salmoniere P, Lassau F, Lagrange P, Morel P. Human herpesvirus 8 seroprevalence in an STD clinic in Paris: a study of 512 patients. Sex Transm Dis. 2002;29(11):698-702.
26. Dukers NH, Renwick N, Prins M, Geskus RB, Schulz TF, Weverling GJ, et al. Risk factors for human herpesvirus 8 seropositivity and seroconversion in a cohort of homosexual men. Am J Epidemiol. 2000;151(3):213-24.
27. Osmond DH, Buchbinder S, Cheng A, Graves A, Vittinghoff E, Cossen CK, et al. Prevalence of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection in homosexual men at beginning of and during the HIV epidemic. Jama. 2002;287(2):221-5.
28. Valdarchi C, Serraino D, Cordiali Fei P, Castilletti C, Trento E, Farchi F, et al. Demographic indicators and risk of infection with human herpesvirus type 8 in Central Italy. Infection. 2007;35(1):22-5.
29. Baeten JM, Chohan BH, Lavreys L, Rakwar JP, Ashley R, Richardson BA, et al. Correlates of human herpesvirus 8 seropositivity among heterosexual men in Kenya. AIDS. 2002;16(15):2073-8.
30. Pfeiffer RM, Wheeler WA, Mbisa G, Whitby D, Goedert JJ, de The G, et al. Geographic heterogeneity of prevalence of the human herpesvirus 8 in sub-Saharan Africa: clues about etiology. Ann Epidemiol. 2010;20(12):958-63.
31. Wakeham K, Webb EL, Sebina I, Nalwoga A, Muhangi L, Miley W, et al. Risk factors for seropositivity to Kaposi sarcoma-associated herpesvirus among children in Uganda. J Acquir Immune Defic Syndr. 2013;63(2):228-33.
32. Anderson LA, Li Y, Graubard BI, Whitby D, Mbisa G, Tan S, et al. Human herpesvirus 8 seroprevalence among children and adolescents in the United States. Pediatr Infect Dis J. 2008;27(7):661-4.

33. Engels EA, Atkinson JO, Graubard BI, McQuillan GM, Gamache C, Mbisa G, et al. Risk factors for human herpesvirus 8 infection among adults in the United States and evidence for sexual transmission. J Infect Dis. 2007;196(2):199-207.
34. Smith NA, Sabin CA, Gopal R, Bourboulia D, Labbet W, Boshoff C, et al. Serologic evidence of human herpesvirus 8 transmission by homosexual but not heterosexual sex. J Infect Dis. 1999;180(3):600-6.
35. Martin JN, Ganem DE, Osmond DH, Page-Shafer KA, Macrae D, Kedes DH. Sexual transmission and the natural history of human herpesvirus 8 infection. N Engl J Med. 1998;338(14):948-54.
36. O'Brien TR, Kedes D, Ganem D, Macrae DR, Rosenberg PS, Molden J, et al. Evidence for concurrent epidemics of human herpesvirus 8 and human immunodeficiency virus type 1 in US homosexual men: rates, risk factors, and relationship to Kaposi's sarcoma. J Infect Dis. 1999;180(4):1010-7.
37. Crum NF, Wallace MR, Stephan K, Blazes DL, Aronson N, Tasker SA, et al. Correlates of human herpesvirus-8 seropositivity among U.S. military members recently infected with human immunodeficiency virus. Sex Transm Dis. 2003;30(9):713-8.
38. Gutierrez-Ortega P, Hierro-Orozco S, Sanchez-Cisneros R, Montano LF. Kaposi's sarcoma in a 6-day-old infant with human immunodeficiency virus. Arch Dermatol. 1989;125(3):432-3.
39. Lisco A, Barbierato M, Fiore JR, Gasperini P, Favia A, Volpe A, et al. Pregnancy and human herpesvirus 8 reactivation in human immunodeficiency virus type 1-infected women. J Clin Microbiol. 2006;44(11):3863-71.
40. Mantina H, Kankasa C, Klaskala W, Brayfield B, Campbell J, Du Q, et al. Vertical transmission of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. Int J Cancer. 2001;94(5):749-52.
41. Dedicoat M, Newton R, Alkharsah KR, Sheldon J, Szabados I, Ndlovu B, et al. Mother-to-child transmission of human herpesvirus-8 in South Africa. J Infect Dis. 2004;190(6):1068-75.
42. Brayfield BP, Kankasa C, West JT, Muyanga J, Bhat G, Klaskala W, et al. Distribution of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8 in maternal saliva and breast milk in Zambia: implications for transmission. J Infect Dis. 2004;189(12):2260-70.
43. Butler LM, Dorsey G, Hladik W, Rosenthal PJ, Brander C, Neilands TB, et al. Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) seroprevalence in population-based samples of African children: evidence for at least 2 patterns of KSHV transmission. J Infect Dis. 2009;200(3):430-8.
44. Casper C, Krantz E, Selke S, Kuntz SR, Wang J, Huang ML, et al. Frequent and asymptomatic oropharyngeal shedding of human herpesvirus 8 among immunocompetent men. J Infect Dis. 2007;195(1):30-6.
45. Phipps W, Saracino M, Selke S, Huang ML, Jaoko W, Mandaliya K, et al. Oral HHV-8 replication among women in Mombasa, Kenya. J Med Virol. 2014;86(10):1759-65.
46. de Souza VA, Sumita LM, Nascimento MC, Oliveira J, Mascheretti M, Quiroga M, et al. Human herpesvirus-8 infection and oral shedding in Amerindian and non-Amerindian populations in the Brazilian Amazon region. J Infect Dis. 2007;196(6):844-52.
47. Vamvakas EC. Is human herpesvirus-8 transmitted by transfusion? Transfus Med Rev. 2010;24(1):1-14.
48. Gobbini F, Owusu-Ofori S, Marcelin AG, Candotti D, Allain JP. Human herpesvirus 8 transfusion transmission in Ghana, an endemic region of West Africa. Transfusion. 2012;52(11):2294-9.
49. Dollard SC, Nelson KE, Ness PM, Stambolis V, Kuehnert MJ, Pellett PE, et al. Possible transmission of human herpesvirus-8 by blood transfusion in a historical United States cohort. Transfusion. 2005;45(4):500-3.
50. Wang X, He B, Zhang Z, Liu T, Wang H, Li X, et al. Human herpesvirus-8 in northwestern China: epidemiology and characterization among blood donors. Virol J. 2010;7:62.
51. Hladik W, Dollard SC, Mermin J, Fowlkes AL, Downing R, Amin MM, et al. Transmission of human herpesvirus 8 by blood transfusion. N Engl J Med. 2006;355(13):1331-8.
52. Hladik W, Pellett PE, Hancock J, Downing R, Gao H, Packel L, et al. Association between transfusion with human herpesvirus 8 antibody-positive blood and subsequent mortality. J Infect Dis. 2012;206(10):1497-503.
53. Cannon MJ, Dollard SC, Smith DK, Klein RS, Schuman P, Rich JD, et al. Blood-borne and sexual transmission of human herpesvirus 8 in women with or at risk for human immunodeficiency virus infection. N Engl J Med. 2001;344(9):637-43.
54. Eltom MA, Mbulaiteye SM, Dada AJ, Whitby D, Biggar RJ. Transmission of human herpesvirus 8 by sexual activity among adults in Lagos, Nigeria. AIDS. 2002;16(18):2473-8.
55. Lavreys L, Chohan B, Ashley R, Richardson BA, Corey L, Mandaliya K, et al. Human herpesvirus 8: seroprevalence and correlates in prostitutes in Mombasa, Kenya. J Infect Dis. 2003;187(3):359-63.
56. Malope BI, MacPhail P, Mbisa G, MacPhail C, Stein L, Ratshikhopha EM, et al. No evidence of sexual transmission of Kaposi's sarcoma herpes virus in a heterosexual South African population. Aids. 2008;22(4):519-26.
57. Plancoulaine S, Gessain A. [Epidemiological aspects of human herpesvirus 8 infection and of Kaposi's sarcoma]. Med Mal Infect. 2005;35(5):314-21.
58. Parkin DM. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. Int J Cancer. 2006;118(12):3030-44.
59. International Agency for Research on Cancer - World Health Organization - Globocan 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012 [31/07/2015]. Available from: http://globocan.iarc.fr/Default.aspx.
60. Surveillance Epidemiology and End Results Program - Kaposi Sarcoma Number of Cases 2012 [31/07/2015]. Available from: http://seer.cancer.gov/csr/1975_2012/results_merged/sect_10_kaposi_sarcoma.pdf - search=kaposi.
61. Stiller CA, Trama A, Brewster DH, Verne J, Bouchardy C, Navarro C, et al. Descriptive epidemiology of Kaposi sarcoma in Europe. Report from the RARECARE project. Cancer Epidemiol. 2014;38(6):670-8.
62. Cottoni F, De Marco R, Montesu MA. Classical Kaposi's sarcoma in north-east Sardinia: an overview from 1977 to 1991. Br J Cancer. 1996;73(9):1132-3.

63. Geddes M, Franceschi S, Barchielli A, Falcini F, Carli S, Cocconi G, et al. Kaposi's sarcoma in Italy before and after the AIDS epidemic. Br J Cancer. 1994;69(2):333-6.
64. Geddes M, Franceschi S, Balzi D, Arniani S, Gafa L, Zanetti R. Birthplace and classic Kaposi's sarcoma in Italy. Associazione Italiana Registri Tumori. J Natl Cancer Inst. 1995;87(13):1015-7.
65. Mendez JC, Paya CV. Kaposi's Sarcoma and Transplantation. Herpes. 2000;7(1):18-23.
66. Euvrard S, Kanitakis J, Claudy A. Skin cancers after organ transplantation. N Engl J Med. 2003;348(17):1681-91.
67. Raeisi D, Payandeh M, Madani SH, Zare ME, Kansestani AN, Hashemian AH. Kaposi's Sarcoma after Kidney Transplantation: a 21-Years Experience. Int J Hematol Oncol Stem Cell Res. 2013;7(4):29-33.
68. Hosseini-Moghaddam SM, Soleimanirahbar A, Mazzulli T, Rotstein C, Husain S. Post renal transplantation Kaposi's sarcoma: a review of its epidemiology, pathogenesis, diagnosis, clinical aspects, and therapy. Transpl Infect Dis. 2012;14(4):338-45.
69. Kolhe N, Mamode N, Van der Walt J, Pattison J. Regression of post-transplant Kaposi's sarcoma using sirolimus. Int J Clin Pract. 2006;60(11):1509-12.
70. Campistol JM, Schena FP. Kaposi's sarcoma in renal transplant recipients--the impact of proliferation signal inhibitors. Nephrol Dial Transplant. 2007;22 Suppl 1:i17-22.
71. Martinez V, Caumes E. Maladie de Kaposi. In: Doin, editor. VIH édition 2011.
72. Ackerman AB. Subtle clues to diagnosis by conventional microscopy. The patch stage of Kaposi's sarcoma. Am J Dermatopathol. 1979;1(2):165-72.
73. McNutt NS, Fletcher V, Conant MA. Early lesions of Kaposi's sarcoma in homosexual men. An ultrastructural comparison with other vascular proliferations in skin. Am J Pathol. 1983;111(1):62-77.
74. Modlin RL, Hofman FM, Kempf RA, Taylor CR, Conant MA, Rea TH. Kaposi's sarcoma in homosexual men: an immunohistochemical study. J Am Acad Dermatol. 1983;8(5):620-7.
75. Sturzl M, Brandstetter H, Roth WK. Kaposi's sarcoma: a review of gene expression and ultrastructure of KS spindle cells in vivo. AIDS Res Hum Retroviruses. 1992;8(10):1753-63.
76. Gao SJ, Kingsley L, Hoover DR, Spira TJ, Rinaldo CR, Saah A, et al. Seroconversion to antibodies against Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-related latent nuclear antigens before the development of Kaposi's sarcoma. N Engl J Med. 1996;335(4):233-41.
77. Moore PS, Kingsley LA, Holmberg SD, Spira T, Gupta P, Hoover DR, et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection prior to onset of Kaposi's sarcoma. Aids. 1996;10(2):175-80.
78. Sakakibara S, Tosato G. Viral interleukin-6: role in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus: associated malignancies. J Interferon Cytokine Res. 2011;31(11):791-801.
79. Cesarman E, Nador RG, Bai F, Bohenzky RA, Russo JJ, Moore PS, et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus contains G protein-coupled receptor and cyclin D homologs which are expressed in Kaposi's sarcoma and malignant lymphoma. J Virol. 1996;70(11):8218-23.
80. Feldman ER, Kara M, Coleman CB, Grau KR, Oko LM, Krueger BJ, et al. Virus-encoded microRNAs facilitate gammaherpesvirus latency and pathogenesis in vivo. MBio. 2014;5(3):e00981-14.
81. Moody R, Zhu Y, Huang Y, Cui X, Jones T, Bedolla R, et al. KSHV microRNAs mediate cellular transformation and tumorigenesis by redundantly targeting cell growth and survival pathways. PLoS Pathog. 2013;9(12):e1003857.
82. Suffert G, Malterer G, Hausser J, Viiliainen J, Fender A, Contrant M, et al. Kaposi's sarcoma herpesvirus microRNAs target caspase 3 and regulate apoptosis. PLoS Pathog. 2011;7(12):e1002405.
83. Ramalingam D, Happel C, Ziegelbauer JM. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus microRNAs repress breakpoint cluster region protein expression, enhance Rac1 activity, and increase in vitro angiogenesis. J Virol. 2015;89(8):4249-61.
84. Cai Q, Verma SC, Lu J, Robertson ES. Molecular biology of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus and related oncogenesis. Adv Virus Res. 2010;78:87-142.
85. Uppal T, Banerjee S, Sun Z, Verma SC, Robertson ES. KSHV LANA--the master regulator of KSHV latency. Viruses. 2014;6(12):4961-98.
86. Yogev O, Boshoff C. Redefining KSHV latency. Cell Host Microbe. 2013;13(4):373-4.
87. Chang H, Dittmer DP, Shin YC, Hong Y, Jung JU. Role of Notch signal transduction in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus gene expression. J Virol. 2005;79(22):14371-82.
88. Chang HH, Ganem D. A unique herpesviral transcriptional program in KSHV-infected lymphatic endothelial cells leads to mTORC1 activation and rapamycin sensitivity. Cell Host Microbe. 2013;13(4):429-40.
89. Spiller OB, Robinson M, O'Donnell E, Milligan S, Morgan BP, Davison AJ, et al. Complement regulation by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORF4 protein. J Virol. 2003;77(1):592-9.
90. Lee HR, Lee S, Chaudhary PM, Gill P, Jung JU. Immune evasion by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. Future Microbiol. 2010;5(9):1349-65.
91. Lagos D, Vart RJ, Gratrix F, Westrop SJ, Emuss V, Wong PP, et al. Toll-like receptor 4 mediates innate immunity to Kaposi sarcoma herpesvirus. Cell Host Microbe. 2008;4(5):470-83.
92. Coscoy L, Ganem D. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes two proteins that block cell surface display of MHC class I chains by enhancing their endocytosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000;97(14):8051-6.
93. Ishido S, Wang C, Lee BS, Cohen GB, Jung JU. Downregulation of major histocompatibility complex class I molecules by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K3 and K5 proteins. J Virol. 2000;74(11):5300-9.
94. Coscoy L, Ganem D. A viral protein that selectively downregulates ICAM-1 and B7-2 and modulates T cell costimulation. J Clin Invest. 2001;107(12):1599-606.
95. Nicholas J. Human gammaherpesvirus cytokines and chemokine receptors. J Interferon Cytokine Res. 2005;25(7):373-83.

96. Weber KS, Grone HJ, Rocken M, Klier C, Gu S, Wank R, et al. Selective recruitment of Th2-type cells and evasion from a cytotoxic immune response mediated by viral macrophage inhibitory protein-II. Eur J Immunol. 2001;31(8):2458-66.
97. Stine JT, Wood C, Hill M, Epp A, Raport CJ, Schweickart VL, et al. KSHV-encoded CC chemokine vMIP-III is a CCR4 agonist, stimulates angiogenesis, and selectively chemoattracts TH2 cells. Blood. 2000;95(4):1151-7.
98. Kledal TN, Rosenkilde MM, Coulin F, Simmons G, Johnsen AH, Alouani S, et al. A broad-spectrum chemokine antagonist encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. Science. 1997;277(5332):1656-9.
99. Ciufo DM, Cannon JS, Poole LJ, Wu FY, Murray P, Ambinder RF, et al. Spindle cell conversion by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus: formation of colonies and plaques with mixed lytic and latent gene expression in infected primary dermal microvascular endothelial cell cultures. J Virol. 2001;75(12):5614-26.
100. Wang HW, Trotter MW, Lagos D, Bourboulia D, Henderson S, Makinen T, et al. Kaposi sarcoma herpesvirus-induced cellular reprogramming contributes to the lymphatic endothelial gene expression in Kaposi sarcoma. Nat Genet. 2004;36(7):687-93.
101. Alkharsah KR, Singh VV, Bosco R, Santag S, Grundhoff A, Konrad A, et al. Deletion of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus FLICE inhibitory protein, vFLIP, from the viral genome compromises the activation of STAT1-responsive cellular genes and spindle cell formation in endothelial cells. J Virol. 2011;85(19):10375-88.
102. Grossmann C, Podgrabinska S, Skobe M, Ganem D. Activation of NF-kappaB by the latent vFLIP gene of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus is required for the spindle shape of virus-infected endothelial cells and contributes to their proinflammatory phenotype. J Virol. 2006;80(14):7179-85.
103. Moses AV, Jarvis MA, Raggo C, Bell YC, Ruhl R, Luukkonen BG, et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-induced upregulation of the c-kit proto-oncogene, as identified by gene expression profiling, is essential for the transformation of endothelial cells. J Virol. 2002;76(16):8383-99.
104. Raggo C, Ruhl R, McAllister S, Koon H, Dezube BJ, Fruh K, et al. Novel cellular genes essential for transformation of endothelial cells by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. Cancer Res. 2005;65(12):5084-95.
105. Fonsato V, Buttiglieri S, Deregibus MC, Bussolati B, Caselli E, Di Luca D, et al. PAX2 expression by HHV-8-infected endothelial cells induced a proangiogenic and proinvasive phenotype. Blood. 2008;111(5):2806-15.
106. Hong YK, Foreman K, Shin JW, Hirakawa S, Curry CL, Sage DR, et al. Lymphatic reprogramming of blood vascular endothelium by Kaposi sarcoma-associated herpesvirus. Nat Genet. 2004;36(7):683-5.
107. Belanger C, Gravel A, Tomoiu A, Janelle ME, Gosselin J, Tremblay MJ, et al. Human herpesvirus 8 viral FLICE-inhibitory protein inhibits Fas-mediated apoptosis through binding and prevention of procaspase-8 maturation. J Hum Virol. 2001;4(2):62-73.
108. Sarid R, Sato T, Bohenzky RA, Russo JJ, Chang Y. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes a functional bcl-2 homologue. Nat Med. 1997;3(3):293-8.
109. Aoki Y, Jaffe ES, Chang Y, Jones K, Teruya-Feldstein J, Moore PS, et al. Angiogenesis and hematopoiesis induced by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded interleukin-6. Blood. 1999;93(12):4034-43.
110. Yang TY, Chen SC, Leach MW, Manfra D, Homey B, Wiekowski M, et al. Transgenic expression of the chemokine receptor encoded by human herpesvirus 8 induces an angioproliferative disease resembling Kaposi's sarcoma. J Exp Med. 2000;191(3):445-54.
111. Guo HG, Sadowska M, Reid W, Tschachler E, Hayward G, Reitz M. Kaposi's sarcoma-like tumors in a human herpesvirus 8 ORF74 transgenic mouse. J Virol. 2003;77(4):2631-9.
112. Montaner S, Sodhi A, Molinolo A, Bugge TH, Sawai ET, He Y, et al. Endothelial infection with KSHV genes in vivo reveals that vGPCR initiates Kaposi's sarcomagenesis and can promote the tumorigenic potential of viral latent genes. Cancer Cell. 2003;3(1):23-36.
113. Verma SC, Lan K, Robertson E. Structure and function of latency-associated nuclear antigen. Curr Top Microbiol Immunol. 2007;312:101-36.
114. Stedman W, Deng Z, Lu F, Lieberman PM. ORC, MCM, and histone hyperacetylation at the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latent replication origin. J Virol. 2004;78(22):12566-75.
115. Xiao B, Verma SC, Cai Q, Kaul R, Lu J, Saha A, et al. Bub1 and CENP-F can contribute to Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus genome persistence by targeting LANA to kinetochores. J Virol. 2010;84(19):9718-32.
116. Si H, Robertson ES. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded latency-associated nuclear antigen induces chromosomal instability through inhibition of p53 function. J Virol. 2006;80(2):697-709.
117. Watanabe T, Sugaya M, Atkins AM, Aquilino EA, Yang A, Borris DL, et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency-associated nuclear antigen prolongs the life span of primary human umbilical vein endothelial cells. J Virol. 2003;77(11):6188-96.
118. Cai QL, Knight JS, Verma SC, Zald P, Robertson ES. EC5S ubiquitin complex is recruited by KSHV latent antigen LANA for degradation of the VHL and p53 tumor suppressors. PLoS Pathog. 2006;2(10):e116.
119. Cai Q, Xiao B, Si H, Cervini A, Gao J, Lu J, et al. Kaposi's sarcoma herpesvirus upregulates Aurora A expression to promote p53 phosphorylation and ubiquitylation. PLoS Pathog. 2012;8(3):e1002566.
120. Radkov SA, Kellam P, Boshoff C. The latent nuclear antigen of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus targets the retinoblastoma-E2F pathway and with the oncogene Hras transforms primary rat cells. Nat Med. 2000;6(10):1121-7.
121. Murakami Y, Yamagoe S, Noguchi K, Takebe Y, Takahashi N, Uehara Y, et al. Ets-1-dependent expression of vascular endothelial growth factor receptors is activated by latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus through interaction with Daxx. J Biol Chem. 2006;281(38):28113-21.
122. Simonart T. Role of environmental factors in the pathogenesis of classic and African-endemic Kaposi sarcoma. Cancer Lett. 2006;244(1):1-7.
123. Beral V, Peterman TA, Berkelman RL, Jaffe HW. Kaposi's sarcoma among persons with AIDS: a sexually transmitted infection? Lancet. 1990;335(8682):123-8.

124. Engels EA, Pfeiffer RM, Goedert JJ, Virgo P, McNeel TS, Scoppa SM, et al. Trends in cancer risk among people with AIDS in the United States 1980-2002. Aids. 2006;20(12):1645-54.
125. Hleyhel M, Belot A, Bouvier AM, Tattevin P, Pacanowski J, Genet P, et al. Risk of AIDS-defining cancers among HIV-1-infected patients in France between 1992 and 2009: results from the FHDH-ANRS CO4 cohort. Clin Infect Dis. 2013;57(11):1638-47.
126. Robbins HA, Pfeiffer RM, Shiels MS, Li J, Hall HI, Engels EA. Excess cancers among HIV-infected people in the United States. J Natl Cancer Inst. 2015;107(4).
127. Hayward GS. Initiation of angiogenic Kaposi's sarcoma lesions. Cancer Cell. 2003;3(1):1-3.
128. Jacobson LP, Jenkins FJ, Springer G, Munoz A, Shah KV, Phair J, et al. Interaction of human immunodeficiency virus type 1 and human herpesvirus type 8 infections on the incidence of Kaposi's sarcoma. J Infect Dis. 2000;181(6):1940-9.
129. Veugelers PJ, Strathdee SA, Kaldor JM, Shafer KA, Moss AR, Schechter MT, et al. Associations of age, immunosuppression, and AIDS among homosexual men in the Tricontinental Seroconverter Study. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol. 1997;14(5):435-41.
130. Galleu A, Fozza C, Simula MP, Contini S, Virdis P, Corda G, et al. CD4+ and CD8+ T-cell skewness in classic Kaposi sarcoma. Neoplasia. 2012;14(6):487-94.
131. Barillari G, Buonaguro L, Fiorelli V, Hoffman J, Michaels F, Gallo RC, et al. Effects of cytokines from activated immune cells on vascular cell growth and HIV-1 gene expression. Implications for AIDS-Kaposi's sarcoma pathogenesis. J Immunol. 1992;149(11):3727-34.
132. Touloumi G, Hatzakis A, Potouridou I, Milona I, Strarigos J, Katsambas A, et al. The role of immunosuppression and immune-activation in classic Kaposi's sarcoma. Int J Cancer. 1999;82(6):817-21.
133. Ensoli B, Sgadari C, Barillari G, Sirianni MC, Sturzl M, Monini P. Biology of Kaposi's sarcoma. Eur J Cancer. 2001;37(10):1251-69.
134. Ruocco V, Astarita C, Guerrera V, Lo Schiavo A, Moscariello CG, Satriano RA, et al. Kaposi's sarcoma on a lymphedematous immunocompromised limb. Int J Dermatol. 1984;23(1):56-60.
135. Ruocco V, Satriano RA, Bernabo R, Astarita C. [Regional abnormalities of the lymphatic vessels and of the response to dinitrochlorobenzene in classical Kaposi's sarcoma]. Ann Dermatol Venereol. 1985;112(3):283-6.
136. Ziegler JL. Endemic Kaposi's sarcoma in Africa and local volcanic soils. Lancet. 1993;342(8883):1348-51.
137. Coluzzi M, Calabro ML, Manno D, Chieco-Bianchi L, Schulz TF, Ascoli V. Reduced seroprevalence of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV), human herpesvirus 8 (HHV8), related to suppression of Anopheles density in Italy. Med Vet Entomol. 2003;17(4):461-4.
138. Ascoli V, Facchinelli L, Valerio L, Zucchetto A, Dal Maso L, Coluzzi M. Distribution of mosquito species in areas with high and low incidence of classic Kaposi's sarcoma and seroprevalence for HHV-8. Med Vet Entomol. 2006;20(2):198-208.
139. McHardy J, Williams EH, Geser A, de-The G, Beth E, Giraldo G. Endemic Kaposi's sarcoma: incidence and risk factors in the West Nile District of Uganda. Int J Cancer. 1984;33(2):203-12.
140. Taylor JF, Smith PG, Bull D, Pike MC. Kaposi's sarcoma in Uganda: geographic and ethnic distribution. Br J Cancer. 1972;26(6):483-97.
141. Montella M, Franceschi S, Geddes M, Arniani S, Cocchiarella G. Classic Kaposi's sarcoma and volcanic soil in southern Italy. Lancet. 1996;347(9005):905.
142. Ziegler JL, Newton R, Katongole-Mbidde E, Mbulataiye S, De Cock K, Wabinga H, et al. Risk factors for Kaposi's sarcoma in HIV-positive subjects in Uganda. Aids. 1997;11(13):1619-26.
143. Simonart T, Noel JC, Andrei G, Parent D, Van Vooren JP, Hermans P, et al. Iron as a potential co-factor in the pathogenesis of Kaposi's sarcoma? Int J Cancer. 1998;78(6):720-6.
144. Simonart T, Degraef C, Andrei G, Mosselmans R, Hermans P, Van Vooren JP, et al. Iron chelators inhibit the growth and induce the apoptosis of Kaposi's sarcoma cells and of their putative endothelial precursors. J Invest Dermatol. 2000;115(5):893-900.
145. Simonart T, Degraef C, Stordeur P, Noel JC, Mosselmans R, Van Vooren JP, et al. Iron induces Bcl-2 expression in human dermal microvascular endothelial cells. Free Radic Res. 2001;34(3):221-35.
146. Dai J, Huang C, Wu J, Yang C, Frenkel K, Huang X. Iron-induced interleukin-6 gene expression: possible mediation through the extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase pathways. Toxicology. 2004;203(1-3):199-209.
147. Simonart T, De Dobbeleer G, Stallenberg B. Classic Kaposi's sarcoma of the palm in a metallurgist: role of iron filings in its development? Br J Dermatol. 2003;148(5):1061-3.
148. Haverkos HW, Kopstein AN, Wilson H, Drotman P. Nitrite inhalants: history, epidemiology, and possible links to AIDS. Environ Health Perspect. 1994;102(10):858-61.
149. Jorgensen KA, Lawesson SO. Amyl nitrite and Kaposi's sarcoma in homosexual men. N Engl J Med. 1982;307(14):893-4.
150. Haverkos HW, Pinsky PF, Drotman DP, Bregman DJ. Disease manifestation among homosexual men with acquired immunodeficiency syndrome: a possible role of nitrites in Kaposi's sarcoma. Sex Transm Dis. 1985;12(4):203-8.
151. Haverkos HW. Viruses, chemicals and co-carcinogenesis. Oncogene. 2004;23(38):6492-9.
152. Bilen N, Bayramgurler D, Aydeniz B, Apaydin R, Ozkara SK. Possible causal role of lisinopril in a case of Kaposi's sarcoma. Br J Dermatol. 2002;147(5):1042-4.
153. Puppin D, Jr., Rybojad M, de la Chapelle C, Morel P. Kaposi's sarcoma associated with captopril. Lancet. 1990;336(8725):1251-2.
154. Larbre JP, Nicolas JF, Collet P, Larbre B, Llorca G. Kaposi's sarcoma in a patient with rheumatoid arthritis possible responsibility of captopril in the development of lesions. J Rheumatol. 1991;18(3):476-7.

155. Dervis E, Demirkesen C. Kaposi's sarcoma in a patient with psoriasis vulgaris. Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat. 2010;19(3):31-4.
156. Dalbeth N, Edwards J, Fairchild S, Callan M, Hall FC. The non-thiol angiotensin-converting enzyme inhibitor quinapril suppresses inflammatory arthritis. Rheumatology (Oxford). 2005;44(1):24-31.
157. Vogt B, Frey FJ. Inhibition of angiogenesis in Kaposi's sarcoma by captopril. Lancet. 1997;349(9059):1148.
158. Regnier-Rosencher E, Boutron I, Avril MF, Dupin N. Do anti-hypertensive renin-angiotensin system inhibitors contribute to the development of classical Kaposi sarcoma? J Eur Acad Dermatol Venereol. 2015.
159. Bisacchi D, Noonan DM, Carlone S, Albini A, Pfeffer U. Kaposi's sarcoma and human chorionic gonadotropin: mechanisms, moieties and mysteries. Biol Chem. 2002;383(9):1315-20.
160. Ross RK, Casagrande JT, Dworsky RL, Levine A, Mack T. Kaposi's sarcoma in Los Angeles, California. J Natl Cancer Inst. 1985;75(6):1011-5.
161. Kaloterakis A, Papasteriades C, Filiotou A, Economidou J, Hadjiyannis S, Stratigos J. HLA in familial and nonfamilial Mediterranean Kaposi's sarcoma in Greece. Tissue Antigens. 1995;45(2):117-9.
162. Papasteriades C, Kaloterakis A, Filiotou A, Economidou J, Nicolis G, Trichopoulos D, et al. Histocompatibility antigens HLA-A, -B, -DR in Greek patients with Kaposi's sarcoma. Tissue Antigens. 1984;24(5):313-5.
163. Pollack MS, Safai B, Myskowski PL, Gold JW, Pandey J, Dupont B. Frequencies of HLA and Gm immunogenetic markers in Kaposi's sarcoma. Tissue Antigens. 1983;21(1):1-8.
164. Melbye M, Kestens L, Biggar RJ, Schreuder GM, Gigase PL. HLA studies of endemic African Kaposi's sarcoma patients and matched controls: no association with HLA-DR5. Int J Cancer. 1987;39(2):182-4.
165. Mann DL, Murray C, O'Donnell M, Blattner WA, Goedert JJ. HLA antigen frequencies in HIV-1-related Kaposi's sarcoma. J Acquir Immune Defic Syndr. 1990;3 Suppl 1:S51-5.
166. Tornesello ML, Buonaguro L, Cristillo M, Biryahwaho B, Downing R, Hatzakis A, et al. MDM2 and CDKN1A gene polymorphisms and risk of Kaposi's sarcoma in African and Caucasian patients. Biomarkers. 2011;16(1):42-50.
167. Brown EE, Fallin D, Ruczinski I, Hutchinson A, Staats B, Vitale F, et al. Associations of classic Kaposi sarcoma with common variants in genes that modulate host immunity. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2006;15(5):926-34.
168. Gazouli M, Zavos G, Papaconstantinou I, Lukas JC, Zografidis A, Boletis J, et al. The interleukin-6-174 promoter polymorphism is associated with a risk of development of Kaposi's sarcoma in renal transplant recipients. Anticancer Res. 2004;24(2C):1311-4.
169. Douglas JL, Gustin JK, Moses AV, Dezube BJ, Pantanowitz L. Kaposi Sarcoma Pathogenesis: A Triad of Viral Infection, Oncogenesis and Chronic Inflammation. Transl Biomed. 2010;1(2).
170. Sirianni MC, Vincenzi L, Fiorelli V, Topino S, Scala E, Uccini S, et al. gamma-Interferon production in peripheral blood mononuclear cells and tumor infiltrating lymphocytes from Kaposi's sarcoma patients: correlation with the presence of human herpesvirus-8 in peripheral blood mononuclear cells and lesional macrophages. Blood. 1998;91(3):968-76.
171. Feller L, Wood NH, Lemmer J. HIV-associated Kaposi sarcoma: pathogenic mechanisms. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2007;104(4):521-9.
172. Knowlton ER, Rappocciolo G, Piazza P, Lepone LM, Nadgir SV, Bullotta A, et al. Human herpesvirus 8 induces polyfunctional B lymphocytes that drive Kaposi's sarcoma. MBio. 2014;5(5):e01277-14.
173. Ascherl G, Sgadari C, Bugarini R, Bogner J, Schatz O, Ensoli B, et al. Serum concentrations of fibroblast growth factor 2 are increased in HIV type 1-infected patients and inversely related to survival probability. AIDS Res Hum Retroviruses. 2001;17(11):1035-9.
174. Rizzardini G, Piconi S, Ruzzante S, Fusi ML, Lukwiya M, Declich S, et al. Immunological activation markers in the serum of African and European HIV-seropositive and seronegative individuals. AIDS. 1996;10(13):1535-42.
175. Aboulafia D, Miles SA, Saks SR, Mitsuyasu RT. Intravenous recombinant tumor necrosis factor in the treatment of AIDS-related Kaposi's sarcoma. J Acquir Immune Defic Syndr. 1989;2(1):54-8.
176. Albrecht H, Stellbrink HJ, Gross G, Berg B, Helmchen U, Mensing H. Treatment of atypical leishmaniasis with interferon gamma resulting in progression of Kaposi's sarcoma in an AIDS patient. Clin Investig. 1994;72(12):1041-7.
177. Ganser A, Brucher W, Brodt HR, Busch W, Brandhorst I, Helm EB, et al. Treatment of AIDS-related Kaposi's sarcoma with recombinant gamma-interferon. Onkologie. 1986;9(3):163-6.
178. Krigel RL, Odajnyk CM, Laubenstein LJ, Ostreicher R, Wernz J, Vilcek J, et al. Therapeutic trial of interferon-gamma in patients with epidemic Kaposi's sarcoma. J Biol Response Mod. 1985;4(4):358-64.
179. Fiorelli V, Barillari G, Toschi E, Sgadari C, Monini P, Sturzl M, et al. IFN-gamma induces endothelial cells to proliferate and to invade the extracellular matrix in response to the HIV-1 Tat protein: implications for AIDS-Kaposi's sarcoma pathogenesis. J Immunol. 1999;162(2):1165-70.
180. Samaniego F, Markham PD, Gallo RC, Ensoli B. Inflammatory cytokines induce AIDS-Kaposi's sarcoma-derived spindle cells to produce and release basic fibroblast growth factor and enhance Kaposi's sarcoma-like lesion formation in nude mice. J Immunol. 1995;154(7):3582-92.
181. Ensoli B, Markham P, Kao V, Barillari G, Fiorelli V, Gendelman R, et al. Block of AIDS-Kaposi's sarcoma (KS) cell growth, angiogenesis, and lesion formation in nude mice by antisense oligonucleotide targeting basic fibroblast growth factor. A novel strategy for the therapy of KS. J Clin Invest. 1994;94(5):1736-46.
182. Wang JF, Liu ZY, Anand AR, Zhang X, Brown LF, Dezube BJ, et al. Alpha-chemokine-mediated signal transduction in human Kaposi's sarcoma spindle cells. Biochim Biophys Acta. 2004;1691(2-3):129-39.
183. Klouche M, Brockmeyer N, Knabbe C, Rose-John S. Human herpesvirus 8-derived viral IL-6 induces PTX3 expression in Kaposi's sarcoma cells. AIDS. 2002;16(8):F9-18.
184. Liu C, Okruzhnov Y, Li H, Nicholas J. Human herpesvirus 8 (HHV-8)-encoded cytokines induce expression of and autocrine signaling by vascular endothelial growth factor (VEGF) in HHV-8-infected primary-effusion lymphoma cell lines and mediate VEGF-independent antiapoptotic effects. J Virol. 2001;75(22):10933-40.

185. Bais C, Santomasso B, Coso O, Arvanitakis L, Raaka EG, Gutkind JS, et al. G-protein-coupled receptor of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus is a viral oncogene and angiogenesis activator. Nature. 1998;391(6662):86-9.
186. Schwarz M, Murphy PM. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus G protein-coupled receptor constitutively activates NF-kappa B and induces proinflammatory cytokine and chemokine production via a C-terminal signaling determinant. J Immunol. 2001;167(1):505-13.
187. Rosenkilde MM, Kledal TN, Brauner-Osborne H, Schwartz TW. Agonists and inverse agonists for the herpesvirus 8-encoded constitutively active seven-transmembrane oncogene product, ORF-74. J Biol Chem. 1999;274(2):956-61.
188. Couty JP, Lupu-Meiri M, Oron Y, Gershengorn MC. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-G protein-coupled receptor-expressing endothelial cells exhibit reduced migration and stimulated chemotaxis by chemokine inverse agonists. J Pharmacol Exp Ther. 2009;329(3):1142-7.
189. Shirozu M, Nakano T, Inazawa J, Tashiro K, Tada H, Shinohara T, et al. Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene. Genomics. 1995;28(3):495-500.
190. Janowski M. Functional diversity of SDF-1 splicing variants. Cell Adh Migr. 2009;3(3):243-9.
191. Yu L, Cecil J, Peng SB, Schrementi J, Kovacevic S, Paul D, et al. Identification and expression of novel isoforms of human stromal cell-derived factor 1. Gene. 2006;374:174-9.
192. Bignon A, Biajoux V, Bouchet-Delbos L, Emilie D, Lortholary O, Balabanian K. [CXCR4, a therapeutic target in rare immunodeficiencies?]. Med Sci (Paris). 2011;27(4):391-7.
193. Ponomaryov T, Peled A, Petit I, Taichman RS, Habler L, Sandbank J, et al. Induction of the chemokine stromal-derived factor-1 following DNA damage improves human stem cell function. J Clin Invest. 2000;106(11):1331-9.
194. Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, Tepper OM, Bastidas N, Kleinman ME, et al. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. Nat Med. 2004;10(8):858-64.
195. Tabatabai G, Frank B, Mohle R, Weller M, Wick W. Irradiation and hypoxia promote homing of haematopoietic progenitor cells towards gliomas by TGF-beta-dependent HIF-1alpha-mediated induction of CXCL12. Brain. 2006;129(Pt 9):2426-35.
196. Hitchon C, Wong K, Ma G, Reed J, Lyttle D, El-Gabalawy H. Hypoxia-induced production of stromal cell-derived factor 1 (CXCL12) and vascular endothelial growth factor by synovial fibroblasts. Arthritis Rheum. 2002;46(10):2587-97.
197. Davis DA, Singer KE, De La Luz Sierra M, Narazaki M, Yang F, Fales HM, et al. Identification of carboxypeptidase N as an enzyme responsible for C-terminal cleavage of stromal cell-derived factor-1alpha in the circulation. Blood. 2005;105(12):4561-8.
198. Amara A, Lorthioir O, Valenzuela A, Magerus A, Thelen M, Montes M, et al. Stromal cell-derived factor-1alpha associates with heparan sulfates through the first beta-strand of the chemokine. J Biol Chem. 1999;274(34):23916-25.
199. Murphy JW, Cho Y, Sachpatzidis A, Fan C, Hodsdon ME, Lolis E. Structural and functional basis of CXCL12 (stromal cell-derived factor-1 alpha) binding to heparin. J Biol Chem. 2007;282(13):10018-27.
200. De La Luz Sierra M, Yang F, Narazaki M, Salvucci O, Davis D, Yarchoan R, et al. Differential processing of stromal-derived factor-1alpha and stromal-derived factor-1beta explains functional diversity. Blood. 2004;103(7):2452-9.
201. Bachelerie F, Ben-Baruch A, Burkhardt AM, Combadiere C, Farber JM, Graham GJ, et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. [corrected]. LXXXIX. Update on the extended family of chemokine receptors and introducing a new nomenclature for atypical chemokine receptors. Pharmacol Rev. 2014;66(1):1-79.
202. Ratajczak MZ, Kim C, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J. The expanding family of bone marrow homing factors for hematopoietic stem cells: stromal derived factor 1 is not the only player in the game. ScientificWorldJournal. 2012;2012:758512.
203. Cheng M, Qin G. Progenitor cell mobilization and recruitment: SDF-1, CXCR4, alpha4-integrin, and c-kit. Prog Mol Biol Transl Sci. 2012;111:243-64.
204. Ding L, Morrison SJ. Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. Nature. 2013;495(7440):231-5.
205. Rettig MP, Ansstas G, DiPersio JF. Mobilization of hematopoietic stem and progenitor cells using inhibitors of CXCR4 and VLA-4. Leukemia. 2012;26(1):34-53.
206. Kucia M, Wojakowski W, Reca R, Machalinski B, Gozdzik J, Majka M, et al. The migration of bone marrow-derived non-hematopoietic tissue-committed stem cells is regulated in an SDF-1-, HGF-, and LIF-dependent manner. Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2006;54(2):121-35.
207. Lee E, Han J, Kim K, Choi H, Cho EG, Lee TR. CXCR7 mediates SDF1-induced melanocyte migration. Pigment Cell Melanoma Res. 2013;26(1):58-66.
208. Belmadani A, Jung H, Ren D, Miller RJ. The chemokine SDF-1/CXCL12 regulates the migration of melanocyte progenitors in mouse hair follicles. Differentiation. 2009;77(4):395-411.
209. Bleul CC, Farzan M, Choe H, Parolin C, Clark-Lewis I, Sodroski J, et al. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. Nature. 1996;382(6594):829-33.
210. Oberlin E, Amara A, Bachelerie F, Bessia C, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, et al. The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. Nature. 1996;382(6594):833-5.
211. Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. Science. 1996;272(5263):872-7.
212. Berson JF, Long D, Doranz BJ, Rucker J, Jirik FR, Doms RW. A seven-transmembrane domain receptor involved in fusion and entry of T-cell-tropic human immunodeficiency virus type 1 strains. J Virol. 1996;70(9):6288-95.
213. Doranz BJ, Orsini MJ, Turner JD, Hoffman TL, Berson JF, Hoxie JA, et al. Identification of CXCR4 domains that support coreceptor and chemokine receptor functions. J Virol. 1999;73(4):2752-61.
214. Duda DG, Kozin SV, Kirkpatrick ND, Xu L, Fukumura D, Jain RK. CXCL12 (SDF1alpha)-CXCR4/CXCR7 pathway inhibition: an emerging sensitizer for anticancer therapies? Clin Cancer Res. 2011;17(8):2074-80.

215. Toth PT, Ren D, Miller RJ. Regulation of CXCR4 receptor dimerization by the chemokine SDF-1alpha and the HIV-1 coat protein gp120: a fluorescence resonance energy transfer (FRET) study. J Pharmacol Exp Ther. 2004;310(1):8-17.
216. Busillo JM, Armando S, Sengupta R, Meucci O, Bouvier M, Benovic JL. Site-specific phosphorylation of CXCR4 is dynamically regulated by multiple kinases and results in differential modulation of CXCR4 signaling. J Biol Chem. 2010;285(10):7805-17.
217. Fong AM, Premont RT, Richardson RM, Yu YR, Lefkowitz RJ, Patel DD. Defective lymphocyte chemotaxis in beta-arrestin2- and GRK6-deficient mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99(11):7478-83.
218. Sun Y, Cheng Z, Ma L, Pei G. Beta-arrestin2 is critically involved in CXCR4-mediated chemotaxis, and this is mediated by its enhancement of p38 MAPK activation. J Biol Chem. 2002;277(51):49212-9.
219. Cheng ZJ, Zhao J, Sun Y, Hu W, Wu YL, Cen B, et al. beta-arrestin differentially regulates the chemokine receptor CXCR4-mediated signaling and receptor internalization, and this implicates multiple interaction sites between beta-arrestin and CXCR4. J Biol Chem. 2000;275(4):2479-85.
220. Lagane B, Chow KY, Balabanian K, Levoye A, Harriague J, Planchenault T, et al. CXCR4 dimerization and beta-arrestin-mediated signaling account for the enhanced chemotaxis to CXCL12 in WHIM syndrome. Blood. 2008;112(1):34-44.
221. Biajoux V, Bignon A, Freitas C, Martinez V, Thelen M, Lima G, et al. Expression of CXCL12 receptors in B cells from Mexican Mestizos patients with systemic Lupus erythematosus. J Transl Med. 2012;10:251.
222. Tachibana K, Hirota S, Iizasa H, Yoshida H, Kawabata K, Kataoka Y, et al. The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. Nature. 1998;393(6685):591-4.
223. Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, Takakura N, Nishikawa S, Kitamura Y, et al. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. Nature. 1996;382(6592):635-8.
224. Balabanian K, Lagane B, Infantino S, Chow KY, Harriague J, Moepps B, et al. The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. J Biol Chem. 2005;280(42):35760-6.
225. Burns JM, Summers BC, Wang Y, Melikian A, Berahovich R, Miao Z, et al. A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. J Exp Med. 2006;203(9):2201-13.
226. Rajagopal S, Kim J, Ahn S, Craig S, Lam CM, Gerard NP, et al. Beta-arrestin- but not G protein-mediated signaling by the "decoy" receptor CXCR7. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107(2):628-32.
227. Sierro F, Biben C, Martinez-Munoz L, Mellado M, Ransohoff RM, Li M, et al. Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104(37):14759-64.
228. Hattermann K, Mentlein R. An infernal trio: the chemokine CXCL12 and its receptors CXCR4 and CXCR7 in tumor biology. Ann Anat. 2013;195(2):103-10.
229. Kumar R, Tripathi V, Ahmad M, Nath N, Mir RA, Chauhan SS, et al. CXCR7 mediated Gialpha independent activation of ERK and Akt promotes cell survival and chemotaxis in T cells. Cell Immunol. 2012;272(2):230-41.
230. Berahovich RD, Zabel BA, Lewen S, Walters MJ, Ebsworth K, Wang Y, et al. Endothelial expression of CXCR7 and the regulation of systemic CXCL12 levels. Immunology. 2014;141(1):111-22.
231. Sun YX, Schneider A, Jung Y, Wang J, Dai J, Wang J, et al. Skeletal localization and neutralization of the SDF-1(CXCL12)/CXCR4 axis blocks prostate cancer metastasis and growth in osseous sites in vivo. J Bone Miner Res. 2005;20(2):318-29.
232. Machelon V, Gaudin F, Camilleri-Broet S, Nasreddine S, Bouchet-Delbos L, Pujade-Lauraine E, et al. CXCL12 expression by healthy and malignant ovarian epithelial cells. BMC Cancer. 2011;11:97.
233. Hernandez L, Magalhaes MA, Coniglio SJ, Condeelis JS, Segall JE. Opposing roles of CXCR4 and CXCR7 in breast cancer metastasis. Breast Cancer Res. 2011;13(6):R128.
234. Burger JA, Kipps TJ. CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. Blood. 2006;107(5):1761-7.
235. Heinrich EL, Lee W, Lu J, Lowy AM, Kim J. Chemokine CXCL12 activates dual CXCR4 and CXCR7-mediated signaling pathways in pancreatic cancer cells. J Transl Med. 2012;10:68.
236. Sun X, Cheng G, Hao M, Zheng J, Zhou X, Zhang J, et al. CXCL12 / CXCR4 / CXCR7 chemokine axis and cancer progression. Cancer Metastasis Rev. 2010;29(4):709-22.
237. Domanska UM, Kruizinga RC, Nagengast WB, Timmer-Bosscha H, Huls G, de Vries EG, et al. A review on CXCR4/CXCL12 axis in oncology: no place to hide. Eur J Cancer. 2013;49(1):219-30.
238. Ho TK, Shiwen X, Abraham D, Tsui J, Baker D. Stromal-Cell-Derived Factor-1 (SDF-1)/CXCL12 as Potential Target of Therapeutic Angiogenesis in Critical Leg Ischaemia. Cardiol Res Pract. 2012;2012:143209.
239. Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. Nature. 2001;410(6824):50-6.
240. Kucia M, Reca R, Miekus K, Wanzeck J, Wojakowski W, Janowska-Wieczorek A, et al. Trafficking of normal stem cells and metastasis of cancer stem cells involve similar mechanisms: pivotal role of the SDF-1-CXCR4 axis. Stem Cells. 2005;23(7):879-94.
241. Kijima T, Maulik G, Ma PC, Tibaldi EV, Turner RE, Rollins B, et al. Regulation of cellular proliferation, cytoskeletal function, and signal transduction through CXCR4 and c-Kit in small cell lung cancer cells. Cancer Res. 2002;62(21):6304-11.
242. Fernandis AZ, Prasad A, Band H, Klosel R, Ganju RK. Regulation of CXCR4-mediated chemotaxis and chemoinvasion of breast cancer cells. Oncogene. 2004;23(1):157-67.
243. Decaillot FM, Kazmi MA, Lin Y, Ray-Saha S, Sakmar TP, Sachdev P. CXCR7/CXCR4 heterodimer constitutively recruits beta-arrestin to enhance cell migration. J Biol Chem. 2011;286(37):32188-97.

244. Brand S, Dambacher J, Beigel F, Olszak T, Diebold J, Otte JM, et al. CXCR4 and CXCL12 are inversely expressed in colorectal cancer cells and modulate cancer cell migration, invasion and MMP-9 activation. Exp Cell Res. 2005;310(1):117-30.
245. Tang CH, Tan TW, Fu WM, Yang RS. Involvement of matrix metalloproteinase-9 in stromal cell-derived factor-1/CXCR4 pathway of lung cancer metastasis. Carcinogenesis. 2008;29(1):35-43.
246. Miyanishi N, Suzuki Y, Simizu S, Kuwabara Y, Banno K, Umezawa K. Involvement of autocrine CXCL12/CXCR4 system in the regulation of ovarian carcinoma cell invasion. Biochem Biophys Res Commun. 2010;403(1):154-9.
247. Zhang R, Pan X, Huang Z, Weber GF, Zhang G. Osteopontin enhances the expression and activity of MMP-2 via the SDF-1/CXCR4 axis in hepatocellular carcinoma cell lines. PLoS One. 2011;6(8):e23831.
248. Twizere JC, Springael JY, Boxus M, Burny A, Dequiedt F, Dewulf JF, et al. Human T-cell leukemia virus type-1 Tax oncoprotein regulates G-protein signaling. Blood. 2007;109(3):1051-60.
249. Arai M, Ohashi T, Tsukahara T, Murakami T, Hori T, Uchiyama T, et al. Human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein induces the expression of lymphocyte chemoattractant SDF-1/PBSF. Virology. 1998;241(2):298-303.
250. Balabanian K, Lagane B, Pablos JL, Laurent L, Planchenault T, Verola O, et al. WHIM syndromes with different genetic anomalies are accounted for by impaired CXCR4 desensitization to CXCL12. Blood. 2005;105(6):2449-57.
251. Chow KY, Brotin E, Ben Khalifa Y, Carthagena L, Teissier S, Danckaert A, et al. A pivotal role for CXCL12 signaling in HPV-mediated transformation of keratinocytes: clues to understanding HPV-pathogenesis in WHIM syndrome. Cell Host Microbe. 2010;8(6):523-33.
252. Zhao B, Mar JC, Maruo S, Lee S, Gewurz BE, Johannsen E, et al. Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C regulated genes in lymphoblastoid cell lines. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108(1):337-42.
253. Li J, Zhang XS, Xie D, Deng HX, Gao YF, Chen QY, et al. Expression of immune-related molecules in primary EBV-positive Chinese nasopharyngeal carcinoma: associated with latent membrane protein 1 (LMP1) expression. Cancer Biol Ther. 2007;6(12):1997-2004.
254. Pablos JL, Amara A, Bouloc A, Santiago B, Caruz A, Galindo M, et al. Stromal-cell derived factor is expressed by dendritic cells and endothelium in human skin. Am J Pathol. 1999;155(5):1577-86.
255. Yao L, Salvucci O, Cardones AR, Hwang ST, Aoki Y, De La Luz Sierra M, et al. Selective expression of stromal-derived factor-1 in the capillary vascular endothelium plays a role in Kaposi sarcoma pathogenesis. Blood. 2003;102(12):3900-5.
256. Puchert M, Engele J. The peculiarities of the SDF-1/CXCL12 system: in some cells, CXCR4 and CXCR7 sing solos, in others, they sing duets. Cell Tissue Res. 2014;355(2):239-53.
257. Hao M, Zheng J, Hou K, Wang J, Chen X, Lu X, et al. Role of chemokine receptor CXCR7 in bladder cancer progression. Biochem Pharmacol. 2012;84(2):204-14.
258. Miao Z, Luker KE, Summers BC, Berahovich R, Bhojani MS, Rehemtulla A, et al. CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumor growth in vivo and is expressed on tumor-associated vasculature. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104(40):15735-40.
259. Singh RK, Lokeshwar BL. The IL-8-regulated chemokine receptor CXCR7 stimulates EGFR signaling to promote prostate cancer growth. Cancer Res. 2011;71(9):3268-77.
260. Xu H, Wu Q, Dang S, Jin M, Xu J, Cheng Y, et al. Alteration of CXCR7 expression mediated by TLR4 promotes tumor cell proliferation and migration in human colorectal carcinoma. PLoS One. 2011;6(12):e27399.
261. Yates TJ, Knapp J, Gosalbez M, Lokeshwar SD, Gomez CS, Benitez A, et al. C-X-C chemokine receptor 7: a functionally associated molecular marker for bladder cancer. Cancer. 2013;119(1):61-71.
262. Kanbe K, Takagishi K, Chen Q. Stimulation of matrix metalloprotease 3 release from human chondrocytes by the interaction of stromal cell-derived factor 1 and CXC chemokine receptor 4. Arthritis Rheum. 2002;46(1):130-7.
263. Scott-Algara D, Balabanian K, Chakrabarti LA, Mouthon L, Dromer F, Didier C, et al. Idiopathic CD4+ T-cell lymphocytopenia is associated with impaired membrane expression of the chemokine receptor CXCR4. Blood. 2010;115(18):3708-17.
264. Balkwill F. The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4. Semin Cancer Biol. 2004;14(3):171-9.
265. Chatterjee S, Behnam Azad B, Nimmagadda S. The intricate role of CXCR4 in cancer. Adv Cancer Res. 2014;124:31-82.
266. Balkwill F. Cancer and the chemokine network. Nat Rev Cancer. 2004;4(7):540-50.
267. Bachelder RE, Wendt MA, Mercurio AM. Vascular endothelial growth factor promotes breast carcinoma invasion in an autocrine manner by regulating the chemokine receptor CXCR4. Cancer Res. 2002;62(24):7203-6.
268. Helbig G, Christopherson KW, 2nd, Bhat-Nakshatri P, Kumar S, Kishimoto H, Miller KD, et al. NF-kappaB promotes breast cancer cell migration and metastasis by inducing the expression of the chemokine receptor CXCR4. J Biol Chem. 2003;278(24):21631-8.
269. Hall JM, Korach KS. Stromal cell-derived factor 1, a novel target of estrogen receptor action, mediates the mitogenic effects of estradiol in ovarian and breast cancer cells. Mol Endocrinol. 2003;17(5):792-803.
270. Staller P, Sulitkova J, Lisztwan J, Moch H, Oakeley EJ, Krek W. Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumour suppressor pVHL. Nature. 2003;425(6955):307-11.
271. Hinton CV, Avraham S, Avraham HK. Role of the CXCR4/CXCL12 signaling axis in breast cancer metastasis to the brain. Clin Exp Metastasis. 2010;27(2):97-105.
272. Liu J, Liao S, Huang Y, Samuel R, Shi T, Naxerova K, et al. PDGF-D improves drug delivery and efficacy via vascular normalization, but promotes lymphatic metastasis by activating CXCR4 in breast cancer. Clin Cancer Res. 2011;17(11):3638-48.

273. Darash-Yahana M, Pikarsky E, Abramovitch R, Zeira E, Pal B, Karplus R, et al. Role of high expression levels of CXCR4 in tumor growth, vascularization, and metastasis. FASEB J. 2004;18(11):1240-2.
274. Eck SM, Cote AL, Winkelman WD, Brinckerhoff CE. CXCR4 and matrix metalloproteinase-1 are elevated in breast carcinoma-associated fibroblasts and in normal mammary fibroblasts exposed to factors secreted by breast cancer cells. Mol Cancer Res. 2009;7(7):1033-44.
275. Kojima Y, Acar A, Eaton EN, Mellody KT, Scheel C, Ben-Porath I, et al. Autocrine TGF-beta and stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) signaling drives the evolution of tumor-promoting mammary stromal myofibroblasts. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107(46):20009-14.
276. Mo W, Chen J, Patel A, Zhang L, Chau V, Li Y, et al. CXCR4/CXCL12 mediate autocrine cell- cycle progression in NF1-associated malignant peripheral nerve sheath tumors. Cell. 2013;152(5):1077-90.
277. Pitt LA, Tikhonova AN, Hu H, Trimarchi T, King B, Gong Y, et al. CXCL12-Producing Vascular Endothelial Niches Control Acute T Cell Leukemia Maintenance. Cancer Cell. 2015;27(6):755-68.
278. Moriuchi M, Moriuchi H, Fauci AS. HTLV type I Tax activation of the CXCR4 promoter by association with nuclear respiratory factor 1. AIDS Res Hum Retroviruses. 1999;15(9):821-7.
279. Kawaguchi A, Orba Y, Kimura T, Iha H, Ogata M, Tsuji T, et al. Inhibition of the SDF-1alpha-CXCR4 axis by the CXCR4 antagonist AMD3100 suppresses the migration of cultured cells from ATL patients and murine lymphoblastoid cells from HTLV-I Tax transgenic mice. Blood. 2009;114(14):2961-8.
280. Amine A, Rivera S, Opolon P, Dekkal M, Biard DS, Bouamar H, et al. Novel anti-metastatic action of cidofovir mediated by inhibition of E6/E7, CXCR4 and Rho/ROCK signaling in HPV tumor cells. PLoS One. 2009;4(3):e5018.
281. Piovan E, Tosello V, Indraccolo S, Cabrelle A, Baesso I, Trentin L, et al. Chemokine receptor expression in EBV-associated lymphoproliferation in hu/SCID mice: implications for CXCL12/CXCR4 axis in lymphoma generation. Blood. 2005;105(3):931-9.
282. Hu J, Deng X, Bian X, Li G, Tong Y, Li Y, et al. The expression of functional chemokine receptor CXCR4 is associated with the metastatic potential of human nasopharyngeal carcinoma. Clin Cancer Res. 2005;11(13):4658-65.
283. Xu J, Deng X, Tang M, Li L, Xiao L, Yang L, et al. Tyrosylprotein sulfotransferase-1 and tyrosine sulfation of chemokine receptor 4 are induced by Epstein-Barr virus encoded latent membrane protein 1 and associated with the metastatic potential of human nasopharyngeal carcinoma. PLoS One. 2013;8(3):e56114.
284. Uccini S, Scarpino S, Ballarini F, Soriani A, Chilosi M, Montesu MA, et al. In situ study of chemokine and chemokine-receptor expression in Kaposi sarcoma. Am J Dermatopathol. 2003;25(5):377-83.
285. Punj V, Matta H, Schamus S, Tamewitz A, Anyang B, Chaudhary PM. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded viral FLICE inhibitory protein (vFLIP) K13 suppresses CXCR4 expression by upregulating miR-146a. Oncogene. 2010;29(12):1835-44.
286. Debnath B, Xu S, Grande F, Garofalo A, Neamati N. Small molecule inhibitors of CXCR4. Theranostics. 2013;3(1):47-75.
287. EMA. Summary of product characteristics - Mozobil [updated 20/05/2015]. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/001030/WC500030686.pdf.
288. Devine SM, Flomenberg N, Vesole DH, Liesveld J, Weisdorf D, Badel K, et al. Rapid mobilization of CD34+ cells following administration of the CXCR4 antagonist AMD3100 to patients with multiple myeloma and non-Hodgkin's lymphoma. J Clin Oncol. 2004;22(6):1095-102.
289. Portella L, Vitale R, De Luca S, D'Alterio C, Ierano C, Napolitano M, et al. Preclinical development of a novel class of CXCR4 antagonist impairing solid tumors growth and metastases. PLoS One. 2013;8(9):e74548.
290. Tamamura H, Hori A, Kanzaki N, Hiramatsu K, Mizumoto M, Nakashima H, et al. T140 analogs as CXCR4 antagonists identified as anti-metastatic agents in the treatment of breast cancer. FEBS Lett. 2003;550(1-3):79-83.
291. Wong D, Kandagatla P, Korz W, Chinni SR. Targeting CXCR4 with CTCE-9908 inhibits prostate tumor metastasis. BMC Urol. 2014;14:12.
292. Burger JA, Peled A. CXCR4 antagonists: targeting the microenvironment in leukemia and other cancers. Leukemia. 2009;23(1):43-52.
293. Chen Y, Ramjiawan RR, Reiberger T, Ng MR, Hato T, Huang Y, et al. CXCR4 inhibition in tumor microenvironment facilitates anti-programmed death receptor-1 immunotherapy in sorafenib-treated hepatocellular carcinoma in mice. Hepatology. 2015;61(5):1591-602.
294. Feig C, Jones JO, Kraman M, Wells RJ, Deonarine A, Chan DS, et al. Targeting CXCL12 from FAP-expressing carcinoma-associated fibroblasts synergizes with anti-PD-L1 immunotherapy in pancreatic cancer. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013;110(50):20212-7.
295. Freitas C, Desnoyer A, Meuris F, Bachelerie F, Balabanian K, Machelon V. The relevance of the chemokine receptor ACKR3/CXCR7 on CXCL12-mediated effects in cancers with a focus on virus-related cancers. Cytokine Growth Factor Rev. 2014;25(3):307-16.
296. Hattermann K, Held-Feindt J, Lucius R, Muerkoster SS, Penfold ME, Schall TJ, et al. The chemokine receptor CXCR7 is highly expressed in human glioma cells and mediates antiapoptotic effects. Cancer Res. 2010;70(8):3299-308.
297. Maishi N, Ohga N, Hida Y, Akiyama K, Kitayama K, Osawa T, et al. CXCR7: a novel tumor endothelial marker in renal cell carcinoma. Pathol Int. 2012;62(5):309-17.
298. Jin Z, Nagakubo D, Shirakawa AK, Nakayama T, Shigeta A, Hieshima K, et al. CXCR7 is inducible by HTLV-1 Tax and promotes growth and survival of HTLV-1-infected T cells. Int J Cancer. 2009;125(9):2229-35.
299. Maier S, Staffler G, Hartmann A, Hock J, Henning K, Grabusic K, et al. Cellular target genes of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2. J Virol. 2006;80(19):9761-71.
300. Spender LC, Lucchesi W, Bodelon G, Bilancio A, Karstegl CE, Asano T, et al. Cell target genes of Epstein-Barr virus transcription factor EBNA-2: induction of the p55alpha regulatory subunit of PI3-kinase and its role in survival of EREB2.5 cells. J Gen Virol. 2006;87(Pt 10):2859-67.

301. Lucchesi W, Brady G, Dittrich-Breiholz O, Kracht M, Russ R, Farrell PJ. Differential gene regulation by Epstein-Barr virus type 1 and type 2 EBNA2. J Virol. 2008;82(15):7456-66.
302. Rickinson AB, Young LS, Rowe M. Influence of the Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA 2 on the growth phenotype of virus-transformed B cells. J Virol. 1987;61(5):1310-7.
303. Cancian L, Bosshard R, Lucchesi W, Karstegl CE, Farrell PJ. C-terminal region of EBNA-2 determines the superior transforming ability of type 1 Epstein-Barr virus by enhanced gene regulation of LMP-1 and CXCR7. PLoS Pathog. 2011;7(7):e1002164.
304. Poole LJ, Yu Y, Kim PS, Zheng QZ, Pevsner J, Hayward GS. Altered patterns of cellular gene expression in dermal microvascular endothelial cells infected with Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. J Virol. 2002;76(7):3395-420.
305. Luker KE, Lewin SA, Mihalko LA, Schmidt BT, Winkler JS, Coggins NL, et al. Scavenging of CXCL12 by CXCR7 promotes tumor growth and metastasis of CXCR4-positive breast cancer cells. Oncogene. 2012;31(45):4750-8.
306. Levoye A, Balabanian K, Baleux F, Bachelerie F, Lagane B. CXCR7 heterodimerizes with CXCR4 and regulates CXCL12-mediated G protein signaling. Blood. 2009;113(24):6085-93.
307. Melo Rde C, Longhini AL, Bigarella CL, Baratti MO, Traina F, Favaro P, et al. CXCR7 is highly expressed in acute lymphoblastic leukemia and potentiates CXCR4 response to CXCL12. PLoS One. 2014;9(1):e85926.
308. Hengge UR, Ruzicka T, Tyring SK, Stuschke M, Roggendorf M, Schwartz RA, et al. Update on Kaposi's sarcoma and other HHV8 associated diseases. Part 2: pathogenesis, Castleman's disease, and pleural effusion lymphoma. Lancet Infect Dis. 2002;2(6):344-52.
309. Cinamon G, Shinder V, Alon R. Shear forces promote lymphocyte migration across vascular endothelium bearing apical chemokines. Nat Immunol. 2001;2(6):515-22.
310. Volin MV, Joseph L, Shockley MS, Davies PF. Chemokine receptor CXCR4 expression in endothelium. Biochem Biophys Res Commun. 1998;242(1):46-53.
311. Robbins HA, Shiels MS, Pfeiffer RM, Engels EA. Epidemiologic contributions to recent cancer trends among HIV-infected people in the United States. AIDS. 2014;28(6):881-90.
312. CDC. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. MMWR Recomm Rep. 1992;41(RR-17):1-19.
313. World Health Organization - Who case definitions of HIV for surveillance and revised clinical staging and immunological classification of HIV-related disease in adults and children 2007 [01/08/2015]. Available from: http://www.who.int/hiv/pub/guidelines/HIVstaging150307.pdf.
314. Atkinson J, Edlin BR, Engels EA, Kral AH, Seal K, Gamache CJ, et al. Seroprevalence of human herpesvirus 8 among injection drug users in San Francisco. J Infect Dis. 2003;187(6):974-81.
315. Mbulaiteye SM, Atkinson JO, Whitby D, Wohl DA, Gallant JE, Royal S, et al. Risk factors for human herpesvirus 8 seropositivity in the AIDS Cancer Cohort Study. J Clin Virol. 2006;35(4):442-9.
316. Gogineni E, Marshall V, Miley W, Bayat A, Whitby D, Kovacs JA, et al. Quantitative determinations of anti-Kaposi sarcoma-associated herpesvirus antibody levels in men who have sex with men. Diagn Microbiol Infect Dis. 2013;76(1):56-60.
317. Theodossiades G, Arvanitakis L, Tsevrenis V, Nomikou E, Zografidis A, Bourboulia D, et al. Prevalence of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection in haemophilic patients. Haemophilia. 2003;9(5):657-9.
318. Eis-Hubinger AM, Matz B, Effenberger W, Brackmann HH, Neipel F. Human herpesvirus 8 infection in haemophiliacs. Thromb Haemost. 2000;84(3):515-7.
319. Maskew M, Macphail AP, Whitby D, Egger M, Wallis CL, Fox MP. Prevalence and predictors of kaposi sarcoma herpes virus seropositivity: a cross-sectional analysis of HIV-infected adults initiating ART in Johannesburg, South Africa. Infect Agent Cancer. 2011;6:22.
320. He J, Bhat G, Kankasa C, Chintu C, Mitchell C, Duan W, et al. Seroprevalence of human herpesvirus 8 among Zambian women of childbearing age without Kaposi's sarcoma (KS) and mother-child pairs with KS. J Infect Dis. 1998;178(6):1787-90.
321. Shebl FM, Dollard SC, Pfeiffer RM, Biryahwaho B, Amin MM, Munuo SS, et al. Human herpesvirus 8 seropositivity among sexually active adults in Uganda. PLoS One. 2011;6(6):e21286.
322. Suligoi B, Dorrucci M, Uccella I, Andreoni M, Rezza G, Italian Seroconversion S. Effect of multiple herpesvirus infections on the progression of HIV disease in a cohort of HIV seroconverters. J Med Virol. 2003;69(2):182-7.
323. Gambus G, Bourboulia D, Esteve A, Lahoz R, Rodriguez C, Bolao F, et al. Prevalence and distribution of HHV-8 in different subpopulations, with and without HIV infection, in Spain. AIDS. 2001;15(9):1167-74.
324. Martro E, Esteve A, Schulz TF, Sheldon J, Gambus G, Munoz R, et al. Risk factors for human Herpesvirus 8 infection and AIDS-associated Kaposi's sarcoma among men who have sex with men in a European multicentre study. Int J Cancer. 2007;120(5):1129-35.
325. Rezza G, Andreoni M, Dorrucci M, Pezzotti P, Monini P, Zerboni R, et al. Human herpesvirus 8 seropositivity and risk of Kaposi's sarcoma and other acquired immunodeficiency syndrome-related diseases. J Natl Cancer Inst. 1999;91(17):1468-74.
326. Melbye M, Cook PM, Hjalgrim H, Begtrup K, Simpson GR, Biggar RJ, et al. Risk factors for Kaposi's-sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/HHV-8) seropositivity in a cohort of homosexual men, 1981-1996. Int J Cancer. 1998;77(4):543-8.
327. Tanon A, Jaquet A, Ekouevi DK, Akakpo J, Adoubi I, Diomande I, et al. The spectrum of cancers in West Africa: associations with human immunodeficiency virus. PLoS One. 2012;7(10):e48108.
328. Stein L, Urban MI, O'Connell D, Yu XQ, Beral V, Newton R, et al. The spectrum of human immunodeficiency virus-associated cancers in a South African black population: results from a case-control study, 1995-2004. Int J Cancer. 2008;122(10):2260-5.

329. Sitas F, Pacella-Norman R, Carrara H, Patel M, Ruff P, Sur R, et al. The spectrum of HIV-1 related cancers in South Africa. Int J Cancer. 2000;88(3):489-92.
330. Mbulaiteye SM, Katabira ET, Wabinga H, Parkin DM, Virgo P, Ochai R, et al. Spectrum of cancers among HIV-infected persons in Africa: the Uganda AIDS-Cancer Registry Match Study. Int J Cancer. 2006;118(4):985-90.
331. Engels EA, Biggar RJ, Hall HI, Cross H, Crutchfield A, Finch JL, et al. Cancer risk in people infected with human immunodeficiency virus in the United States. Int J Cancer. 2008;123(1):187-94.
332. Shiels MS, Pfeiffer RM, Gail MH, Hall HI, Li J, Chaturvedi AK, et al. Cancer burden in the HIV-infected population in the United States. J Natl Cancer Inst. 2011;103(9):753-62.
333. Serraino D, Piselli P, Busnach G, Burra P, Citterio F, Arbustini E, et al. Risk of cancer following immunosuppression in organ transplant recipients and in HIV-positive individuals in southern Europe. Eur J Cancer. 2007;43(14):2117-23.
334. Lisco A, Vanpouille C, Margolis L. Coinfecting viruses as determinants of HIV disease. Curr HIV/AIDS Rep. 2009;6(1):5-12.
335. Gianella S, Massanella M, Wertheim JO, Smith DM. The Sordid Affair Between Human Herpesvirus and HIV. J Infect Dis. 2015:[Epub ahead of print].
336. Leidner RS, Aboulafia DM. Recrudescent Kaposi's sarcoma after initiation of HAART: a manifestation of immune reconstitution syndrome. AIDS Patient Care STDS. 2005;19(10):635-44.
337. Bower M, Nelson M, Young AM, Thirlwell C, Newsom-Davis T, Mandalia S, et al. Immune reconstitution inflammatory syndrome associated with Kaposi's sarcoma. J Clin Oncol. 2005;23(22):5224-8.
338. Letang E, Almeida JM, Miro JM, Ayala E, White IE, Carrilho C, et al. Predictors of immune reconstitution inflammatory syndrome-associated with kaposi sarcoma in mozambique: a prospective study. J Acquir Immune Defic Syndr. 2010;53(5):589-97.
339. Lacombe JM, Boue F, Grabar S, Viget N, Gazaignes S, Lascaux-Cametz AS, et al. Risk of Kaposi sarcoma during the first months on combination antiretroviral therapy. AIDS. 2013;27(4):635-43.
340. Ensoli B, Gendelman R, Markham P, Fiorelli V, Colombini S, Raffeld M, et al. Synergy between basic fibroblast growth factor and HIV-1 Tat protein in induction of Kaposi's sarcoma. Nature. 1994;371(6499):674-80.
341. Barillari G, Sgadari C, Palladino C, Gendelman R, Caputo A, Morris CB, et al. Inflammatory cytokines synergize with the HIV-1 Tat protein to promote angiogenesis and Kaposi's sarcoma via induction of basic fibroblast growth factor and the alpha v beta 3 integrin. J Immunol. 1999;163(4):1929-35.
342. Barillari G, Sgadari C, Fiorelli V, Samaniego F, Colombini S, Manzari V, et al. The Tat protein of human immunodeficiency virus type-1 promotes vascular cell growth and locomotion by engaging the alpha5beta1 and alphavbeta3 integrins and by mobilizing sequestered basic fibroblast growth factor. Blood. 1999;94(2):663-72.
343. Toschi E, Barillari G, Sgadari C, Bacigalupo I, Cereseto A, Carlei D, et al. Activation of matrix-metalloproteinase-2 and membrane-type-1-matrix-metalloproteinase in endothelial cells and induction of vascular permeability in vivo by human immunodeficiency virus-1 Tat protein and basic fibroblast growth factor. Mol Biol Cell. 2001;12(10):2934-46.
344. Secchiero P, Zella D, Capitani S, Gallo RC, Zauli G. Extracellular HIV-1 tat protein up-regulates the expression of surface CXC-chemokine receptor 4 in resting CD4+ T cells. J Immunol. 1999;162(4):2427-31.
345. Prakash O, Tang ZY, He YE, Ali MS, Coleman R, Gill J, et al. Human Kaposi's sarcoma cell-mediated tumorigenesis in human immunodeficiency type 1 tat-expressing transgenic mice. J Natl Cancer Inst. 2000;92(9):721-8.
346. Hyun TS, Subramanian C, Cotter MA, 2nd, Thomas RA, Robertson ES. Latency-associated nuclear antigen encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus interacts with Tat and activates the long terminal repeat of human immunodeficiency virus type 1 in human cells. J Virol. 2001;75(18):8761-71.
347. Harrington W, Jr., Sieczkowski L, Sosa C, Chan-a-Sue S, Cai JP, Cabral L, et al. Activation of HHV-8 by HIV-1 tat. Lancet. 1997;349(9054):774-5.
348. Yen-Moore A, Hudnall SD, Rady PL, Wagner RF, Jr., Moore TO, Memar O, et al. Differential expression of the HHV-8 vGCR cellular homolog gene in AIDS-associated and classic Kaposi's sarcoma: potential role of HIV-1 Tat. Virology. 2000;267(2):247-51.
349. Pati S, Foulke JS, Jr., Barabitskaya O, Kim J, Nair BC, Hone D, et al. Human herpesvirus 8-encoded vGPCR activates nuclear factor of activated T cells and collaborates with human immunodeficiency virus type 1 Tat. J Virol. 2003;77(10):5759-73.
350. Lebbe C, Blum L, Pellet C, Blanchard G, Verola O, Morel P, et al. Clinical and biological impact of antiretroviral therapy with protease inhibitors on HIV-related Kaposi's sarcoma. Aids. 1998;12(7):F45-9.
351. Dupin N, Rubin De Cervens V, Gorin I, Calvez V, Pessis E, Grandadam M, et al. The influence of highly active antiretroviral therapy on AIDS-associated Kaposi's sarcoma. Br J Dermatol. 1999;140(5):875-81.
352. Martellotta F, Berretta M, Vaccher E, Schioppa O, Zanet E, Tirelli U. AIDS-related Kaposi's sarcoma: state of the art and therapeutic strategies. Curr HIV Res. 2009;7(6):634-8.
353. Dupont C, Vasseur E, Beauchet A, Aegerter P, Berthe H, de Truchis P, et al. Long-term efficacy on Kaposi's sarcoma of highly active antiretroviral therapy in a cohort of HIV-positive patients. CISIH 92. Centre d'information et de soins de l'immunodeficience humaine. Aids. 2000;14(8):987-93.
354. Sgadari C, Monini P, Barillari G, Ensoli B. Use of HIV protease inhibitors to block Kaposi's sarcoma and tumour growth. Lancet Oncol. 2003;4(9):537-47.
355. Monini P, Sgadari C, Toschi E, Barillari G, Ensoli B. Antitumour effects of antiretroviral therapy. Nat Rev Cancer. 2004;4(11):861-75.
356. Sgadari C, Barillari G, Toschi E, Carlei D, Bacigalupo I, Baccarini S, et al. HIV protease inhibitors are potent anti-angiogenic molecules and promote regression of Kaposi sarcoma. Nat Med. 2002;8(3):225-32.
357. Monini P, Sgadari C, Grosso MG, Bellino S, Di Biagio A, Toschi E, et al. Clinical course of classic Kaposi's sarcoma in HIV-negative patients treated with the HIV protease inhibitor indinavir. AIDS. 2009;23(4):534-8.

358. Rizzieri DA, Liu J, Traweek ST, Miralles GD. Clearance of HHV-8 from peripheral blood mononuclear cells with a protease inhibitor. Lancet. 1997;349(9054):775-6.
359. Martinez V, Caumes E, Gambotti L, Ittah H, Morini JP, Deleuze J, et al. Remission from Kaposi's sarcoma on HAART is associated with suppression of HIV replication and is independent of protease inhibitor therapy. Br J Cancer. 2006;94(7):1000-6.
360. Portsmouth S, Stebbing J, Gill J, Mandalia S, Bower M, Nelson M, et al. A comparison of regimens based on non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors or protease inhibitors in preventing Kaposi's sarcoma. Aids. 2003;17(11):F17-22.
361. Gill J, Bourboulia D, Wilkinson J, Hayes P, Cope A, Marcelin AG, et al. Prospective study of the effects of antiretroviral therapy on Kaposi sarcoma--associated herpesvirus infection in patients with and without Kaposi sarcoma. J Acquir Immune Defic Syndr. 2002;31(4):384-90.
362. Connick E, Kane MA, White IE, Ryder J, Campbell TB. Immune reconstitution inflammatory syndrome associated with Kaposi sarcoma during potent antiretroviral therapy. Clin Infect Dis. 2004;39(12):1852-5.
363. Lederman MM. Immune restoration and CD4+ T-cell function with antiretroviral therapies. AIDS. 2001;15 Suppl 2:S11-5.
364. Antonelli LR, Mahnke Y, Hodge JN, Porter BO, Barber DL, DerSimonian R, et al. Elevated frequencies of highly activated CD4+ T cells in HIV+ patients developing immune reconstitution inflammatory syndrome. Blood. 2010;116(19):3818-27.
365. Feller L, Lemmer J. Insights into pathogenic events of HIV-associated Kaposi sarcoma and immune reconstitution syndrome related Kaposi sarcoma. Infect Agent Cancer. 2008;3:1.
366. Letang E, Lewis JJ, Bower M, Mosam A, Borok M, Campbell TB, et al. Immune reconstitution inflammatory syndrome associated with Kaposi sarcoma: higher incidence and mortality in Africa than in the UK. AIDS. 2013;27(10):1603-13.
367. La Ferla L, Pinzone MR, Nunnari G, Martellotta F, Lleshi A, Tirelli U, et al. Kaposi' s sarcoma in HIV-positive patients: the state of art in the HAART-era. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2013;17(17):2354-65.
368. Gbabe OF, Okwundu CI, Dedicoat M, Freeman EE. Treatment of severe or progressive Kaposi's sarcoma in HIV-infected adults. Cochrane Database Syst Rev. 2014;8:CD003256.
369. Antoniou T, Tseng AL. Interactions between antiretrovirals and antineoplastic drug therapy. Clin Pharmacokinet. 2005;44(2):111-45.
370. Krown SE, Metroka C, Wernz JC. Kaposi's sarcoma in the acquired immune deficiency syndrome: a proposal for uniform evaluation, response, and staging criteria. AIDS Clinical Trials Group Oncology Committee. J Clin Oncol. 1989;7(9):1201-7.
371. Lilenbaum RC, Ratner L. Systemic treatment of Kaposi's sarcoma: current status and future directions. Aids. 1994;8(2):141-51.
372. Northfelt DW. Treatment of Kaposi's sarcoma. Current guidelines and future perspectives. Drugs. 1994;48(4):569-82.
373. Vanni T, Sprinz E, Machado MW, Santana Rde C, Fonseca BA, Schwartsmann G. Systemic treatment of AIDS-related Kaposi sarcoma: current status and perspectives. Cancer Treat Rev. 2006;32(6):445-55.
374. Maral T. The Koebner phenomenon in immunosuppression-related Kaposi's sarcoma. Ann Plast Surg. 2000;44(6):646-8.
375. Zouboulis CC. Cryosurgery in dermatology. Eur J Dermatol. 1998;8(7):466-74.
376. Kutlubay Z, Kucuktas M, Yardimci G, Engin B, Serdaroglu S. Evaluation of effectiveness of cryotherapy on the treatment of cutaneous Kaposi's sarcoma. Dermatol Surg. 2013;39(10):1502-6.
377. Sgadari C, Bacigalupo I, Barillari G, Ensoli B. Pharmacological management of Kaposi's sarcoma. Expert Opin Pharmacother. 2011;12(11):1669-90.
378. Marchell N, Alster TS. Successful treatment of cutaneous Kaposi's sarcoma by the 585-nm pulsed dye laser. Dermatol Surg. 1997;23(10):973-5.
379. Hauerstock D, Gerstein W, Vuong T. Results of radiation therapy for treatment of classic Kaposi sarcoma. J Cutan Med Surg. 2009;13(1):18-21.
380. Chang JH, Kim IH. Role of radiotherapy in local control of non-AIDS associated Kaposi's sarcoma patients in Korea: a single institution experience. Radiat Oncol J. 2012;30(4):153-7.
381. Klein E, Schwartz RA, Laor Y, Milgrom H, Burgess GH, Holtermann OA. Treatment of Kaposi's sarcoma with vinblastine. Cancer. 1980;45(3):427-31.
382. Brambilla L, Bellinvia M, Tourlaki A, Scoppio B, Gaiani F, Boneschi V. Intralesional vincristine as first-line therapy for nodular lesions in classic Kaposi sarcoma: a prospective study in 151 patients. Br J Dermatol. 2010;162(4):854-9.
383. Cheng C, Michaels J, Scheinfeld N. Alitretinoin: a comprehensive review. Expert Opin Investig Drugs. 2008;17(3):437-43.
384. Caumes E, Guermonprez G, Katlama C, Gentilini M. AIDS-associated mucocutaneous Kaposi's sarcoma treated with bleomycin. Aids. 1992;6(12):1483-7.
385. Martin-Carbonero L, Barrios A, Saballs P, Sirera G, Santos J, Palacios R, et al. Pegylated liposomal doxorubicin plus highly active antiretroviral therapy versus highly active antiretroviral therapy alone in HIV patients with Kaposi's sarcoma. Aids. 2004;18(12):1737-40.
386. Martin-Carbonero L, Palacios R, Valencia E, Saballs P, Sirera G, Santos I, et al. Long-term prognosis of HIV-infected patients with Kaposi sarcoma treated with pegylated liposomal doxorubicin. Clin Infect Dis. 2008;47(3):410-7.
387. Rizza P, Moretti F, Belardelli F. Recent advances on the immunomodulatory effects of IFN-alpha: implications for cancer immunotherapy and autoimmunity. Autoimmunity. 2010;43(3):204-9.
388. Vilcek J. Fifty years of interferon research: aiming at a moving target. Immunity. 2006;25(3):343-8.

389. Emilie D, Burgard M, Lascoux-Combe C, Laughlin M, Krzysiek R, Pignon C, et al. Early control of HIV replication in primary HIV-1 infection treated with antiretroviral drugs and pegylated IFN alpha: results from the Primoferon A (ANRS 086) Study. AIDS. 2001;15(11):1435-7.
390. Asmuth DM, Murphy RL, Rosenkranz SL, Lertora JJ, Kottilil S, Cramer Y, et al. Safety, tolerability, and mechanisms of antiretroviral activity of pegylated interferon Alfa-2a in HIV-1-monoinfected participants: a phase II clinical trial. J Infect Dis. 2010;201(11):1686-96.
391. Shirazi Y, Pitha PM. Alpha interferon inhibits early stages of the human immunodeficiency virus type 1 replication cycle. J Virol. 1992;66(3):1321-8.
392. Dianzani F, Castilletti C, Gentile M, Gelderblom HR, Frezza F, Capobianchi MR. Effects of IFN alpha on late stages of HIV-1 replication cycle. Biochimie. 1998;80(8-9):745-54.
393. Monini P, Carlini F, Sturzl M, Rimessi P, Superti F, Franco M, et al. Alpha interferon inhibits human herpesvirus 8 (HHV-8) reactivation in primary effusion lymphoma cells and reduces HHV-8 load in cultured peripheral blood mononuclear cells. J Virol. 1999;73(5):4029-41.
394. Boue F, Reynes J, Rouzioux C, Emilie D, Souala F, Tubiana R, et al. Alpha interferon administration during structured interruptions of combination antiretroviral therapy in patients with chronic HIV-1 infection: INTERVAC ANRS 105 trial. AIDS. 2011;25(1):115-8.
395. Dianzani F, Rozera G, Abbate I, D'Offizi G, Abdeddaim A, Vlassi C, et al. Interferon may prevent HIV viral rebound after HAART interruption in HIV patients. J Interferon Cytokine Res. 2008;28(1):1-3.
396. Magnone M, Holley JL, Shapiro R, Scantlebury V, McCauley J, Jordan M, et al. Interferon-alpha-induced acute renal allograft rejection. Transplantation. 1995;59(7):1068-70.
397. Krown SE, Li P, Von Roenn JH, Paredes J, Huang J, Testa MA. Efficacy of low-dose interferon with antiretroviral therapy in Kaposi's sarcoma: a randomized phase II AIDS clinical trials group study. J Interferon Cytokine Res. 2002;22(3):295-303.
398. Real FX, Oettgen HF, Krown SE. Kaposi's sarcoma and the acquired immunodeficiency syndrome: treatment with high and low doses of recombinant leukocyte A interferon. J Clin Oncol. 1986;4(4):544-51.
399. Krown SE, Lee JY, Lin L, Fischl MA, Ambinder R, Von Roenn JH. Interferon-alpha2b with protease inhibitor-based antiretroviral therapy in patients with AIDS-associated Kaposi sarcoma: an AIDS malignancy consortium phase I trial. J Acquir Immune Defic Syndr. 2006;41(2):149-53.
400. Lane HC. Interferons in HIV and related diseases. Aids. 1994;8 Suppl 3:S19-23.
401. Krown SE. AIDS-associated Kaposi's sarcoma: is there still a role for interferon alfa? Cytokine Growth Factor Rev. 2007;18(5-6):395-402.
402. van der Ende M, Mulder JW, van den Berge M, Blok W, Schutten M. Complete clinical and virological remission of refractory HIV-related Kaposi's sarcoma with pegylated interferon alpha. Aids. 2007;21(12):1661-2.
403. Remick SC, Reddy M, Herman D, Grace C, Harper G, Willis K, et al. Continuous infusion bleomycin in AIDS-related Kaposi's sarcoma. J Clin Oncol. 1994;12(6):1130-6.
404. Lassoued K, Clauvel JP, Katlama C, Janier M, Picard C, Matheron S. Treatment of the acquired immune deficiency syndrome-related Kaposi's sarcoma with bleomycin as a single agent. Cancer. 1990;66(9):1869-72.
405. Northfelt DW, Martin FJ, Working P, Volberding PA, Russell J, Newman M, et al. Doxorubicin encapsulated in liposomes containing surface-bound polyethylene glycol: pharmacokinetics, tumor localization, and safety in patients with AIDS-related Kaposi's sarcoma. J Clin Pharmacol. 1996;36(1):55-63.
406. Northfelt DW, Dezube BJ, Thommes JA, Miller BJ, Fischl MA, Friedman-Kien A, et al. Pegylated-liposomal doxorubicin versus doxorubicin, bleomycin, and vincristine in the treatment of AIDS-related Kaposi's sarcoma: results of a randomized phase III clinical trial. J Clin Oncol. 1998;16(7):2445-51.
407. Stewart S, Jablonowski H, Goebel FD, Arasteh K, Spittle M, Rios A, et al. Randomized comparative trial of pegylated liposomal doxorubicin versus bleomycin and vincristine in the treatment of AIDS-related Kaposi's sarcoma. International Pegylated Liposomal Doxorubicin Study Group. J Clin Oncol. 1998;16(2):683-91.
408. Gill PS, Wernz J, Scadden DT, Cohen P, Mukwaya GM, von Roenn JH, et al. Randomized phase III trial of liposomal daunorubicin versus doxorubicin, bleomycin, and vincristine in AIDS-related Kaposi's sarcoma. J Clin Oncol. 1996;14(8):2353-64.
409. Tulpule A, Yung RC, Wernz J, Espina BM, Myers A, Scadden DT, et al. Phase II trial of liposomal daunorubicin in the treatment of AIDS-related pulmonary Kaposi's sarcoma. J Clin Oncol. 1998;16(10):3369-74.
410. Brambilla L, Labianca R, Ferrucci SM, Taglioni M, Boneschi V. Treatment of classical Kaposi's sarcoma with gemcitabine. Dermatology. 2001;202(2):119-22.
411. Tulpule A, Groopman J, Saville MW, Harrington W, Jr., Friedman-Kien A, Espina BM, et al. Multicenter trial of low-dose paclitaxel in patients with advanced AIDS-related Kaposi sarcoma. Cancer. 2002;95(1):147-54.
412. Cianfrocca M, Lee S, Von Roenn J, Tulpule A, Dezube BJ, Aboulafia DM, et al. Randomized trial of paclitaxel versus pegylated liposomal doxorubicin for advanced human immunodeficiency virus-associated Kaposi sarcoma: evidence of symptom palliation from chemotherapy. Cancer. 2010;116(16):3969-77.
413. Vaccher E, di Gennaro G, Simonelli C, Schioppa O, Tirelli U. Evidence of activity of Irinotecan in patients with advanced AIDS-related Kaposi's sarcoma. Aids. 2005;19(16):1915-6.
414. Zhou-Pan XR, Seree E, Zhou XJ, Placidi M, Maurel P, Barra Y, et al. Involvement of human liver cytochrome P450 3A in vinblastine metabolism: drug interactions. Cancer Res. 1993;53(21):5121-6.
415. Makinson A, Martelli N, Peyriere H, Turriere C, Le Moing V, Reynes J. Profound neutropenia resulting from interaction between antiretroviral therapy and vinblastine in a patient with HIV-associated Hodgkin's disease. Eur J Haematol. 2007;78(4):358-60.

416. Cingolani A, Torti L, Pinnetti C, de Gaetano Donati K, Murri R, Tacconelli E, et al. Detrimental clinical interaction between ritonavir-boosted protease inhibitors and vinblastine in HIV-infected patients with Hodgkin's lymphoma. AIDS. 2010;24(15):2408-12.
417. Kotb R, Vincent I, Dulioust A, Peretti D, Taburet AM, Delfraissy JF, et al. Life-threatening interaction between antiretroviral therapy and vinblastine in HIV-associated multicentric Castleman's disease. Eur J Haematol. 2006;76(3):269-71.
418. Washington CB, Duran GE, Man MC, Sikic BI, Blaschke TF. Interaction of anti-HIV protease inhibitors with the multidrug transporter P-glycoprotein (P-gp) in human cultured cells. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol. 1998;19(3):203-9.
419. Owellen RJ, Hartke CA, Hains FO. Pharmacokinetics and metabolism of vinblastine in humans. Cancer Res. 1977;37(8 Pt 1):2597-602.
420. Benjamin RS, Riggs CE, Jr., Bachur NR. Plasma pharmacokinetics of adriamycin and its metabolites in humans with normal hepatic and renal function. Cancer Res. 1977;37(5):1416-20.
421. Montgomery MR, Furry J, Fernandez S. Bleomycin inhibits hepatic mixed function oxidation. Res Commun Chem Pathol Pharmacol. 1981;34(2):287-93.
422. Matheny CJ, Lamb MW, Brouwer KR, Pollack GM. Pharmacokinetic and pharmacodynamic implications of P-glycoprotein modulation. Pharmacotherapy. 2001;21(7):778-96.
423. Srinivas RV, Middlemas D, Flynn P, Fridland A. Human immunodeficiency virus protease inhibitors serve as substrates for multidrug transporter proteins MDR1 and MRP1 but retain antiviral efficacy in cell lines expressing these transporters. Antimicrob Agents Chemother. 1998;42(12):3157-62.
424. Ezzat HM, Cheung MC, Hicks LK, Boro J, Montaner JS, Lima VD, et al. Incidence, predictors and significance of severe toxicity in patients with human immunodeficiency virus-associated Hodgkin lymphoma. Leuk Lymphoma. 2012;53(12):2390-6.
425. Cruciani M, Gatti G, Vaccher E, Di Gennaro G, Cinelli R, Bassetti M, et al. Pharmacokinetic interaction between chemotherapy for non-Hodgkin's lymphoma and protease inhibitors in HIV-1-infected patients. J Antimicrob Chemother. 2005;55(4):546-9.
426. Casado JL, Machuca I, Banon S, Moreno A, Molto J, Rodriguez MA. Raltegravir plus two nucleoside analogues as combination antiretroviral therapy in HIV-infected patients who require cancer chemotherapy. Antivir Ther. 2015:[Epub ahead of print].
427. Blanco JL, Whitlock G, Milinkovic A, Moyle G. HIV integrase inhibitors: a new era in the treatment of HIV. Expert Opin Pharmacother. 2015;16(9):1313-24.
428. Weiss J, Haefeli WE. Potential of the novel antiretroviral drug rilpivirine to modulate the expression and function of drug transporters and drug-metabolising enzymes in vitro. Int J Antimicrob Agents. 2013;41(5):484-7.
429. Crauwels H, van Heeswijk RP, Stevens M, Buelens A, Vanveggel S, Boven K, et al. Clinical perspective on drug-drug interactions with the non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor rilpivirine. AIDS Rev. 2013;15(2):87-101.
430. Abel S, Back DJ, Vourvahis M. Maraviroc: pharmacokinetics and drug interactions. Antivir Ther. 2009;14(5):607-18.
431. Soriano V, Perno CF, Kaiser R, Calvez V, Gatell JM, di Perri G, et al. When and how to use maraviroc in HIV-infected patients. AIDS. 2009;23(18):2377-85.
432. Patel IH, Zhang X, Nieforth K, Salgo M, Buss N. Pharmacokinetics, pharmacodynamics and drug interaction potential of enfuvirtide. Clin Pharmacokinet. 2005;44(2):175-86.
433. Kedes DH, Ganem D. Sensitivity of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus replication to antiviral drugs. Implications for potential therapy. J Clin Invest. 1997;99(9):2082-6.
434. Casper C, Krantz EM, Corey L, Kuntz SR, Wang J, Selke S, et al. Valganciclovir for suppression of human herpesvirus-8 replication: a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover trial. J Infect Dis. 2008;198(1):23-30.
435. Glesby MJ, Hoover DR, Weng S, Graham NM, Phair JP, Detels R, et al. Use of antiherpes drugs and the risk of Kaposi's sarcoma: data from the Multicenter AIDS Cohort Study. J Infect Dis. 1996;173(6):1477-80.
436. Mocroft A, Youle M, Gazzard B, Morcinek J, Halai R, Phillips AN. Anti-herpesvirus treatment and risk of Kaposi's sarcoma in HIV infection. Royal Free/Chelsea and Westminster Hospitals Collaborative Group. Aids. 1996;10(10):1101-5.
437. Little RF, Merced-Galindez F, Staskus K, Whitby D, Aoki Y, Humphrey R, et al. A pilot study of cidofovir in patients with kaposi sarcoma. J Infect Dis. 2003;187(1):149-53.
438. Casper C. Defining a role for antiviral drugs in the treatment of persons with HHV-8 infection. Herpes. 2006;13(2):42-7.
439. Klass CM, Krug LT, Pozharskaya VP, Offermann MK. The targeting of primary effusion lymphoma cells for apoptosis by inducing lytic replication of human herpesvirus 8 while blocking virus production. Blood. 2005;105(10):4028-34.
440. Lechowicz M, Dittmer DP, Lee JY, Krown SE, Wachsman W, Aboulafia D, et al. Molecular and clinical assessment in the treatment of AIDS Kaposi sarcoma with valproic Acid. Clin Infect Dis. 2009;49(12):1946-9.
441. Reid EG. Bortezomib-induced Epstein-Barr virus and Kaposi sarcoma herpesvirus lytic gene expression: oncolytic strategies. Curr Opin Oncol. 2011;23(5):482-7.
442. Uttamsingh V, Lu C, Miwa G, Gan LS. Relative contributions of the five major human cytochromes P450, 1A2, 2C9, 2C19, 2D6, and 3A4, to the hepatic metabolism of the proteasome inhibitor bortezomib. Drug Metab Dispos. 2005;33(11):1723-8.
443. Cianfrocca M, Cooley TP, Lee JY, Rudek MA, Scadden DT, Ratner L, et al. Matrix metalloproteinase inhibitor COL-3 in the treatment of AIDS-related Kaposi's sarcoma: a phase I AIDS malignancy consortium study. J Clin Oncol. 2002;20(1):153-9.

444. Dezube BJ, Krown SE, Lee JY, Bauer KS, Aboulafia DM. Randomized phase II trial of matrix metalloproteinase inhibitor COL-3 in AIDS-related Kaposi's sarcoma: an AIDS Malignancy Consortium Study. J Clin Oncol. 2006;24(9):1389-94.
445. Brinker BT, Krown SE, Lee JY, Cesarman E, Chadburn A, Kaplan LD, et al. Phase 1/2 trial of BMS-275291 in patients with human immunodeficiency virus-related Kaposi sarcoma: a multicenter trial of the AIDS Malignancy Consortium. Cancer. 2008;112(5):1083-8.
446. Li J, Zhou S, Huynh H, Chan E. Significant intestinal excretion, one source of variability in pharmacokinetics of COL-3, a chemically modified tetracycline. Pharm Res. 2005;22(3):397-404.
447. Bongiorno MR, Doukaki S, Ferro G, Arico M. Matrix metalloproteinases 2 and 9, and extracellular matrix in Kaposi's sarcoma. Dermatol Ther. 2010;23 Suppl 2:S33-6.
448. Pantanowitz L, Dezube BJ, Hernandez-Barrantes S, Tahan SR, Dabbous MK. Matrix metalloproteinases in the progression and regression of Kaposi's sarcoma. J Cutan Pathol. 2006;33(12):793-8.
449. Barillari G, Sgadari C, Toschi E, Monini P, Ensoli B. HIV protease inhibitors as new treatment options for Kaposi's sarcoma. Drug Resist Updat. 2003;6(4):173-81.
450. Chow WA, Jiang C, Guan M. Anti-HIV drugs for cancer therapeutics: back to the future? Lancet Oncol. 2009;10(1):61-71.
451. Toschi E, Sgadari C, Malavasi L, Bacigalupo I, Chiozzini C, Carlei D, et al. Human immunodeficiency virus protease inhibitors reduce the growth of human tumors via a proteasome-independent block of angiogenesis and matrix metalloproteinases. Int J Cancer. 2011;128(1):82-93.
452. Uldrick TS, Wyvill KM, Kumar P, O'Mahony D, Bernstein W, Aleman K, et al. Phase II study of bevacizumab in patients with HIV-associated Kaposi's sarcoma receiving antiretroviral therapy. J Clin Oncol. 2012;30(13):1476-83.
453. Noy A, von Roenn J, Politsmakher A, Miles S, Bernd C. Fatal hepatorenal failure and thrombocytopenia with SU5416, a vascular endothelial growth factor Flk-1 receptor inhibitor, in AIDS-Kaposi's sarcoma. AIDS. 2007;21(1):113-5.
454. Levine AM, Tulpule A, Quinn DI, Gorospe G, 3rd, Smith DL, Hornor L, et al. Phase I study of antisense oligonucleotide against vascular endothelial growth factor: decrease in plasma vascular endothelial growth factor with potential clinical efficacy. J Clin Oncol. 2006;24(11):1712-9.
455. Bhatt AP, Damania B. AKTivation of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway by KSHV. Front Immunol. 2012;3:401.
456. Montaner S. Akt/TSC/mTOR activation by the KSHV G protein-coupled receptor: emerging insights into the molecular oncogenesis and treatment of Kaposi's sarcoma. Cell Cycle. 2007;6(4):438-43.
457. Sodhi A, Chaisuparat R, Hu J, Ramsdell AK, Manning BD, Sausville EA, et al. The TSC2/mTOR pathway drives endothelial cell transformation induced by the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus G protein-coupled receptor. Cancer Cell. 2006;10(2):133-43.
458. Guba M, von Breitenbuch P, Steinbauer M, Koehl G, Flegel S, Hornung M, et al. Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. Nat Med. 2002;8(2):128-35.
459. Stallone G, Schena A, Infante B, Di Paolo S, Loverre A, Maggio G, et al. Sirolimus for Kaposi's sarcoma in renal-transplant recipients. N Engl J Med. 2005;352(13):1317-23.
460. Mourah S, Porcher R, Battistella M, Kerob D, Guillot B, Jouary T, et al. Paradoxical simultaneous regression and progression of lesions in a phase ii study of everolimus in classic kaposi's sarcoma. Br J Dermatol. 2015:[Epub ahead of print].
461. Krown SE, Roy D, Lee JY, Dezube BJ, Reid EG, Venkataramanan R, et al. Rapamycin with antiretroviral therapy in AIDS-associated Kaposi sarcoma: an AIDS Malignancy Consortium study. J Acquir Immune Defic Syndr. 2012;59(5):447-54.
462. Little RF, Pluda JM, Wyvill KM, Rodriguez-Chavez IR, Tosato G, Catanzaro AT, et al. Activity of subcutaneous interleukin-12 in AIDS-related Kaposi sarcoma. Blood. 2006;107(12):4650-7.
463. Little RF, Aleman K, Kumar P, Wyvill KM, Pluda JM, Read-Connole E, et al. Phase 2 study of pegylated liposomal doxorubicin in combination with interleukin-12 for AIDS-related Kaposi sarcoma. Blood. 2007;110(13):4165-71.
464. Janne PA, Gray N, Settleman J. Factors underlying sensitivity of cancers to small-molecule kinase inhibitors. Nat Rev Drug Discov. 2009;8(9):709-23.
465. Koon HB, Bubley GJ, Pantanowitz L, Masiello D, Smith B, Crosby K, et al. Imatinib-induced regression of AIDS-related Kaposi's sarcoma. J Clin Oncol. 2005;23(5):982-9.
466. Koon HB, Krown SE, Lee JY, Honda K, Rapisuwon S, Wang Z, et al. Phase II trial of imatinib in AIDS-associated Kaposi's sarcoma: AIDS Malignancy Consortium Protocol 042. J Clin Oncol. 2014;32(5):402-8.
467. Peng B, Lloyd P, Schran H. Clinical pharmacokinetics of imatinib. Clin Pharmacokinet. 2005;44(9):879-94.
468. EMA. Summary of product characteristics - Glivec [updated 11/05/2015]. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000406/WC500022207.pdf.
469. EMA. Summary of product characteristics - Sutent [updated 27/07/2015]. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000687/WC500057737.pdf.
470. Ardavanis A, Doufexis D, Kountourakis P, Rigatos G. A Kaposi's sarcoma complete clinical response after sorafenib administration. Ann Oncol. 2008;19(9):1658-9.
471. Lathia C, Lettieri J, Cihon F, Gallentine M, Radtke M, Sundaresan P. Lack of effect of ketoconazole-mediated CYP3A inhibition on sorafenib clinical pharmacokinetics. Cancer Chemother Pharmacol. 2006;57(5):685-92.
472. EMA. Summary of product characteristics - Nexavar [updated 20/01/2015]. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000690/WC500027704.pdf.
473. EMA. Summary of product characteristics - Thalidomide [updated 06/10/2014]. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000823/WC500037050.pdf.

474. EMA. Summary of product characteristics - Revlimid [updated 02/06/2015]. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000717/WC500056018.pdf.
475. EMA. Summary of product characteristics - Imnovid [updated 21/07/2015]. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002682/WC500147717.pdf.
476. Hideshima T, Chauhan D, Shima Y, Raje N, Davies FE, Tai YT, et al. Thalidomide and its analogs overcome drug resistance of human multiple myeloma cells to conventional therapy. Blood. 2000;96(9):2943-50.
477. Kotla V, Goel S, Nischal S, Heuck C, Vivek K, Das B, et al. Mechanism of action of lenalidomide in hematological malignancies. J Hematol Oncol. 2009;2:36.
478. FDA. Label - Revlimid [updated 17/02/2015]. Available from: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2015/021880s041lbl.pdf.
479. Wang M, Dimopoulos MA, Chen C, Cibeira MT, Attal M, Spencer A, et al. Lenalidomide plus dexamethasone is more effective than dexamethasone alone in patients with relapsed or refractory multiple myeloma regardless of prior thalidomide exposure. Blood. 2008;112(12):4445-51.
480. Palumbo A, Freeman J, Weiss L, Fenaux P. The clinical safety of lenalidomide in multiple myeloma and myelodysplastic syndromes. Expert Opin Drug Saf. 2012;11(1):107-20.
481. Hideshima T, Chauhan D, Podar K, Schlossman RL, Richardson P, Anderson KC. Novel therapies targeting the myeloma cell and its bone marrow microenvironment. Semin Oncol. 2001;28(6):607-12.
482. Corral LG, Haslett PA, Muller GW, Chen R, Wong LM, Ocampo CJ, et al. Differential cytokine modulation and T cell activation by two distinct classes of thalidomide analogues that are potent inhibitors of TNF-alpha. J Immunol. 1999;163(1):380-6.
483. Corral LG, Kaplan G. Immunomodulation by thalidomide and thalidomide analogues. Ann Rheum Dis. 1999;58 Suppl 1:I107-13.
484. Muller GW, Chen R, Huang SY, Corral LG, Wong LM, Patterson RT, et al. Amino-substituted thalidomide analogs: potent inhibitors of TNF-alpha production. Bioorg Med Chem Lett. 1999;9(11):1625-30.
485. Bartlett JB, Dredge K, Dalgleish AG. The evolution of thalidomide and its IMiD derivatives as anticancer agents. Nat Rev Cancer. 2004;4(4):314-22.
486. Chang DH, Liu N, Klimek V, Hassoun H, Mazumder A, Nimer SD, et al. Enhancement of ligand-dependent activation of human natural killer T cells by lenalidomide: therapeutic implications. Blood. 2006;108(2):618-21.
487. Lapalombella R, Andritsos L, Liu Q, May SE, Browning R, Pham LV, et al. Lenalidomide treatment promotes CD154 expression on CLL cells and enhances production of antibodies by normal B cells through a PI3-kinase-dependent pathway. Blood. 2010;115(13):2619-29.
488. Noonan K, Rudraraju L, Ferguson A, Emerling A, Pasetti MF, Huff CA, et al. Lenalidomide-induced immunomodulation in multiple myeloma: impact on vaccines and antitumor responses. Clin Cancer Res. 2012;18(5):1426-34.
489. Lu L, Payvandi F, Wu L, Zhang LH, Hariri RJ, Man HW, et al. The anti-cancer drug lenalidomide inhibits angiogenesis and metastasis via multiple inhibitory effects on endothelial cell function in normoxic and hypoxic conditions. Microvasc Res. 2009;77(2):78-86.
490. Gupta D, Treon SP, Shima Y, Hideshima T, Podar K, Tai YT, et al. Adherence of multiple myeloma cells to bone marrow stromal cells upregulates vascular endothelial growth factor secretion: therapeutic applications. Leukemia. 2001;15(12):1950-61.
491. Teo SK. Properties of thalidomide and its analogues: implications for anticancer therapy. Aaps J. 2005;7(1):E14-9.
492. Verhelle D, Corral LG, Wong K, Mueller JH, Moutouh-de Parseval L, Jensen-Pergakes K, et al. Lenalidomide and CC-4047 inhibit the proliferation of malignant B cells while expanding normal CD34+ progenitor cells. Cancer Res. 2007;67(2):746-55.
493. Davies F, Baz R. Lenalidomide mode of action: linking bench and clinical findings. Blood Rev. 2010;24 Suppl 1:S13-9.
494. Haslett PA, Hanekom WA, Muller G, Kaplan G. Thalidomide and a thalidomide analogue drug costimulate virus-specific CD8+ T cells in vitro. J Infect Dis. 2003;187(6):946-55.
495. Wobus M, Benath G, Ferrer RA, Wehner R, Schmitz M, Hofbauer LC, et al. Impact of lenalidomide on the functional properties of human mesenchymal stromal cells. Exp Hematol. 2012;40(10):867-76.
496. Ximeri M, Galanopoulos A, Klaus M, Parcharidou A, Giannikou K, Psyllaki M, et al. Effect of lenalidomide therapy on hematopoiesis of patients with myelodysplastic syndrome associated with chromosome 5q deletion. Haematologica. 2010;95(3):406-14.
497. Li S, Fu J, Ma H, Mapara MY, Lentzsch S. Lenalidomide-induced upregulation of CXCR4 in CD34+ hematopoietic cells, a potential mechanism of decreased hematopoietic progenitor mobilization. Leukemia. 2013;27(6):1407-11.
498. Martinez V, Tateo M, Castilla MA, Melica G, Kirstetter M, Boue F. Lenalidomide in treating AIDS-related Kaposi's sarcoma. Aids. 2011;25(6):878-80.
499. Steff M, Joly V, Di Lucca J, Feldman J, Burg S, Sarda-Mantel L, et al. Clinical activity of lenalidomide in visceral human immunodeficiency virus-related Kaposi sarcoma. JAMA Dermatol. 2013;149(11):1319-22.
500. Fife K, Howard MR, Gracie F, Phillips RH, Bower M. Activity of thalidomide in AIDS-related Kaposi's sarcoma and correlation with HHV8 titre. Int J STD AIDS. 1998;9(12):751-5.
501. Little RF, Wyvill KM, Pluda JM, Welles L, Marshall V, Figg WD, et al. Activity of thalidomide in AIDS-related Kaposi's sarcoma. J Clin Oncol. 2000;18(13):2593-602.
502. Soler RA, Howard M, Brink NS, Gibb D, Tedder RS, Nadal D. Regression of AIDS-related Kaposi's sarcoma during therapy with thalidomide. Clin Infect Dis. 1996;23(3):501-3; discussion 4-5.

503. Rubegni P, Sbano P, De Aloe G, Flori ML, Fimiani M. Thalidomide in the treatment of Kaposi's sarcoma. Dermatology. 2007;215(3):240-4.
504. Ben M'barek L, Fardet L, Mebazaa A, Thervet E, Biet I, Kerob D, et al. A retrospective analysis of thalidomide therapy in non-HIV-related Kaposi's sarcoma. Dermatology. 2007;215(3):202-5.
505. Krown SE. Management of Kaposi sarcoma: the role of interferon and thalidomide. Curr Opin Oncol. 2001;13(5):374-81.
506. Laffitte E. Thalidomide in Kaposi sarcoma: promising or disappointing? Dermatology. 2007;215(3):171-2.
507. Polizzotto MN, Uldrick TS, Wyvill K, Aleman K, Peer C, Figg D, et al. Pomalidomide for Kaposi Sarcoma in People With and Without HIV: A Phase I/II Study. 22th Conference on Retrovirus and Opportunistic Infections; February 23-26, 2015; Seattle, WA, USA2015.
508. Chen TL, Vogelsang GB, Petty BG, Brundrett RB, Noe DA, Santos GW, et al. Plasma pharmacokinetics and urinary excretion of thalidomide after oral dosing in healthy male volunteers. Drug Metab Dispos. 1989;17(4):402-5.
509. Hofmeister CC, Yang X, Pichiorri F, Chen P, Rozewski DM, Johnson AJ, et al. Phase I trial of lenalidomide and CCI-779 in patients with relapsed multiple myeloma: evidence for lenalidomide-CCI-779 interaction via P-glycoprotein. J Clin Oncol. 2011;29(25):3427-34.
510. Chen N, Kasserra C, Kumar G, Palmisano M. Evidence does not support clinically significant lenalidomide-CCI-779 interaction via P-glycoprotein. J Clin Oncol. 2012;30(3):340-1; author reply 1-2.
511. Chen N, Weiss D, Reyes J, Liu L, Kasserra C, Wang X, et al. No clinically significant drug interactions between lenalidomide and Pglycoprotein substrates and inhibitors: results from controlled phase I studies in healthy volunteers. Cancer Chemother Pharmacol. 2014;73(5):1031-9.
512. Takahashi N, Miura M, Kameoka Y, Abumiya M, Sawada K. Drug interaction between lenalidomide and itraconazole. Am J Hematol. 2012;87(3):338-9.
513. Hoffmann M, Kasserra C, Reyes J, Schafer P, Kosek J, Capone L, et al. Absorption, metabolism and excretion of [14C]pomalidomide in humans following oral administration. Cancer Chemother Pharmacol. 2013;71(2):489-501.
514. Kasserra C, Assaf M, Hoffmann M, Li Y, Liu L, Wang X, et al. Pomalidomide: evaluation of cytochrome P450 and transporter-mediated drug-drug interaction potential in vitro and in healthy subjects. J Clin Pharmacol. 2015;55(2):168-78.
515. Lallemand F, Desire N, Rozenbaum W, Nicolas JC, Marechal V. Quantitative analysis of human herpesvirus 8 viral load using a real-time PCR assay. J Clin Microbiol. 2000;38(4):1404-8.
516. ANRS. Echelle ANRS de Cotation de la Gravité des Evénements Indésirables chez l'adulte - Version n° 6 du 9 septembre 2003 2003 [19/07/2015]. Available from: http://www.anrs.fr/content/download/2250/12981/file/ANRS-GradeEI-V6-Fr-2003.pdf.
517. Trojani M, Contesso G, Coindre JM, Rouesse J, Bui NB, de Mascarel A, et al. Soft-tissue sarcomas of adults; study of pathological prognostic variables and definition of a histopathological grading system. Int J Cancer. 1984;33(1):37-42.
518. Jung BH, Rezk NL, Bridges AS, Corbett AH, Kashuba AD. Simultaneous determination of 17 antiretroviral drugs in human plasma for quantitative analysis with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Biomed Chromatogr. 2007;21(10):1095-104.
519. Liu Q, Farley KL, Johnson AJ, Muthusamy N, Hofmeister CC, Blum KA, et al. Development and validation of a highly sensitive liquid chromatography/mass spectrometry method for simultaneous quantification of lenalidomide and flavopiridol in human plasma. Ther Drug Monit. 2008;30(5):620-7.
520. Prise en charge médicale des personnes vivant avec le VIH : actualisation 2014 du rapport Morlat 2013 2014 [04/08/2015]. Available from: http://www.sante.gouv.fr/prise-en-charge-medicale-des-personnes-vivant-avec-le-vih-actualisation-2014-du-rapport-2013.html.
521. Poizot-Martin I, Solas C, Allemand J, Obry-Roguet V, Pradel V, Bregigeon S, et al. Renal impairment in patients receiving a tenofovir-cART regimen: impact of tenofovir trough concentration. J Acquir Immune Defic Syndr. 2013;62(4):375-80.
522. Banon S, Machuca I, Araujo S, Moreno A, Perez-Elias MJ, Moreno S, et al. Efficacy, safety, and lack of interactions with the use of raltegravir in HIV-infected patients undergoing antineoplastic chemotherapy. J Int AIDS Soc. 2014;17(4 Suppl 3):19590.
523. Eltom MA, Jemal A, Mbulaiteye SM, Devesa SS, Biggar RJ. Trends in Kaposi's sarcoma and non-Hodgkin's lymphoma incidence in the United States from 1973 through 1998. J Natl Cancer Inst. 2002;94(16):1204-10.
524. Shiels MS, Pfeiffer RM, Hall HI, Li J, Goedert JJ, Morton LM, et al. Proportions of Kaposi sarcoma, selected non-Hodgkin lymphomas, and cervical cancer in the United States occurring in persons with AIDS, 1980-2007. JAMA. 2011;305(14):1450-9.
525. Dittmer DP, Damania B. Kaposi sarcoma associated herpesvirus pathogenesis (KSHV)--an update. Curr Opin Virol. 2013;3(3):238-44.
526. Cattelan AM, Trevenzoli M, Aversa SM. Recent advances in the treatment of AIDS-related Kaposi's sarcoma. Am J Clin Dermatol. 2002;3(7):451-62.
527. Nasti G, Martellotta F, Berretta M, Mena M, Fasan M, Di Perri G, et al. Impact of highly active antiretroviral therapy on the presenting features and outcome of patients with acquired immunodeficiency syndrome-related Kaposi sarcoma. Cancer. 2003;98(11):2440-6.
528. Kumar S, Rajkumar SV. Thalidomide and lenalidomide in the treatment of multiple myeloma. Eur J Cancer. 2006;42(11):1612-22.
529. Chang X, Zhu Y, Shi C, Stewart AK. Mechanism of immunomodulatory drugs' action in the treatment of multiple myeloma. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai). 2014;46(3):240-53.
530. Chen N, Kasserra C, Reyes J, Liu L, Lau H. Single-dose pharmacokinetics of lenalidomide in healthy volunteers: dose proportionality, food effect, and racial sensitivity. Cancer Chemother Pharmacol. 2012;70(5):717-25.

531. Chen N, Wen L, Lau H, Surapaneni S, Kumar G. Pharmacokinetics, metabolism and excretion of [(14)C]-lenalidomide following oral administration in healthy male subjects. Cancer Chemother Pharmacol. 2012;69(3):789-97.
532. Martiniani R, Di Loreto V, Di Sano C, Lombardo A, Liberati AM. Biological activity of lenalidomide and its underlying therapeutic effects in multiple myeloma. Adv Hematol. 2012;2012:842945.
533. Bartlett JB, Tozer A, Stirling D, Zeldis JB. Recent clinical studies of the immunomodulatory drug (IMiD) lenalidomide. Br J Cancer. 2005;93(6):613-9.
534. Crane E, List A. Lenalidomide: an immunomodulatory drug. Future Oncol. 2005;1(5):575-83.
535. Dredge K, Marriott JB, Macdonald CD, Man HW, Chen R, Muller GW, et al. Novel thalidomide analogues display anti-angiogenic activity independently of immunomodulatory effects. Br J Cancer. 2002;87(10):1166-72.
536. Antar A, El Hajj H, Jabbour M, Khalifeh I, El-Merhi F, Mahfouz R, et al. Primary effusion lymphoma in an elderly patient effectively treated by lenalidomide: case report and review of literature. Blood Cancer J. 2014;4:e190.
537. De Thier F, Simonart T, Hermans P, Andre J, Van Vooren JP, Noel JC. Early- and late-stage Kaposi's sarcoma lesions exhibit similar proliferation fraction. Am J Dermatopathol. 1999;21(1):25-7.
538. Long E, Ilie M, Hofman V, Havet K, Selva E, Butori C, et al. LANA-1, Bcl-2, Mcl-1 and HIF-1alpha protein expression in HIV-associated Kaposi sarcoma. Virchows Arch. 2009;455(2):159-70.
539. Ozen O, Bilezikci B, Celasun B, Demirhan B. Ki-67 proliferation index in Kaposi's sarcoma after renal transplantation: findings in skin-only cases versus cases with internal-organ involvement. Transplant Proc. 2005;37(5):2190-4.
540. Penin RM, Fernandez-Figueras MT, Puig L, Rex J, Ferrandiz C, Ariza A. Over-expression of p45(SKP2) in Kaposi's sarcoma correlates with higher tumor stage and extracutaneous involvement but is not directly related to p27(KIP1) down-regulation. Mod Pathol. 2002;15(11):1227-35.
541. Samaniego F, Markham PD, Gendelman R, Watanabe Y, Kao V, Kowalski K, et al. Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor present in Kaposi's sarcoma (KS) are induced by inflammatory cytokines and synergize to promote vascular permeability and KS lesion development. Am J Pathol. 1998;152(6):1433-43.
542. Mintzer DM, Real FX, Jovino L, Krown SE. Treatment of Kaposi's sarcoma and thrombocytopenia with vincristine in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. Ann Intern Med. 1985;102(2):200-2.
543. Witzig TE, Vose JM, Zinzani PL, Reeder CB, Buckstein R, Polikoff JA, et al. An international phase II trial of single-agent lenalidomide for relapsed or refractory aggressive B-cell non-Hodgkin's lymphoma. Ann Oncol. 2011;22(7):1622-7.
544. Habermann TM, Lossos IS, Justice G, Vose JM, Wiernik PH, McBride K, et al. Lenalidomide oral monotherapy produces a high response rate in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma. Br J Haematol. 2009;145(3):344-9.
545. Ullenhag GJ, Rossmann E, Liljefors M. A phase I dose-escalation study of lenalidomide in combination with gemcitabine in patients with advanced pancreatic cancer. PLoS One. 2015;10(4):e0121197.
546. Amato RJ, Hernandez-McClain J, Saxena S, Khan M. Lenalidomide therapy for metastatic renal cell carcinoma. Am J Clin Oncol. 2008;31(3):244-9.
547. Keizman D, Zahurak M, Sinibaldi V, Carducci M, Denmeade S, Drake C, et al. Lenalidomide in nonmetastatic biochemically relapsed prostate cancer: results of a phase I/II double-blinded, randomized study. Clin Cancer Res. 2010;16(21):5269-76.
548. Berg SL, Cairo MS, Russell H, Ayello J, Ingle AM, Lau H, et al. Safety, pharmacokinetics, and immunomodulatory effects of lenalidomide in children and adolescents with relapsed/refractory solid tumors or myelodysplastic syndrome: a Children's Oncology Group Phase I Consortium report. J Clin Oncol. 2011;29(3):316-23.
549. Richardson PG, Schlossman RL, Weller E, Hideshima T, Mitsiades C, Davies F, et al. Immunomodulatory drug CC-5013 overcomes drug resistance and is well tolerated in patients with relapsed multiple myeloma. Blood. 2002;100(9):3063-7.
550. Richardson PG, Blood E, Mitsiades CS, Jagannath S, Zeldenrust SR, Alsina M, et al. A randomized phase 2 study of lenalidomide therapy for patients with relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma. Blood. 2006;108(10):3458-64.
551. Bartlett JB, Michael A, Clarke IA, Dredge K, Nicholson S, Kristeleit H, et al. Phase I study to determine the safety, tolerability and immunostimulatory activity of thalidomide analogue CC-5013 in patients with metastatic malignant melanoma and other advanced cancers. Br J Cancer. 2004;90(5):955-61.
552. NCI. clinicaltrials - Lenalidomide in Treating Patients With AIDS-Associated Kaposi's Sarcoma - NCT01057121 [updated 09/04/2015]. Available from: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01057121?term=lenalidomide+kaposi&rank=2.
553. Sharma RA, Steward WP, Daines CA, Knight RD, O'Byrne KJ, Dalgleish AG. Toxicity profile of the immunomodulatory thalidomide analogue, lenalidomide: phase I clinical trial of three dosing schedules in patients with solid malignancies. Eur J Cancer. 2006;42(14):2318-25.
554. Tiu RV, Sekeres MA. Lenalidomide in del 5q MDS: responses and side effects revisited. Leuk Res. 2011;35(11):1440-1.
555. Alegre A, Aguado B, Giraldo P, Rios E, Canovas A, Ibanez A, et al. Lenalidomide is effective as salvage therapy in refractory or relapsed multiple myeloma: analysis of the Spanish Compassionate Use Registry in advanced patients. Int J Hematol. 2011;93(3):351-60.
556. Alegre A, Oriol-Rocafiguera A, Garcia-Larana J, Mateos MV, Sureda A, Martinez-Chamorro C, et al. Efficacy, safety and quality-of-life associated with lenalidomide plus dexamethasone for the treatment of relapsed or refractory multiple myeloma: the Spanish experience. Leuk Lymphoma. 2012;53(9):1714-21.
557. Flepisi BT, Bouic P, Sissolak G, Rosenkranz B. Drug-drug interactions in HIV positive cancer patients. Biomed Pharmacother. 2014;68(5):665-77.

558. Tong Z, Yerramilli U, Surapaneni S, Kumar G. The interactions of lenalidomide with human uptake and efflux transporters and UDP-glucuronosyltransferase 1A1: lack of potential for drug-drug interactions. Cancer Chemother Pharmacol. 2014;73(4):869-74.
559. Kumar G, Lau H, Laskin O. Lenalidomide: in vitro evaluation of the metabolism and assessment of cytochrome P450 inhibition and induction. Cancer Chemother Pharmacol. 2009;63(6):1171-5.
560. Lin JH, Chiba M, Chen IW, Nishime JA, deLuna FA, Yamazaki M, et al. Effect of dexamethasone on the intestinal first-pass metabolism of indinavir in rats: evidence of cytochrome P-450 3A [correction of P-450 A] and p-glycoprotein induction. Drug Metab Dispos. 1999;27(10):1187-93.
561. Fardel O, Lecureur V, Guillouzo A. Regulation by dexamethasone of P-glycoprotein expression in cultured rat hepatocytes. FEBS Lett. 1993;327(2):189-93.
562. Cheung MC, Pantanowitz L, Dezube BJ. AIDS-related malignancies: emerging challenges in the era of highly active antiretroviral therapy. Oncologist. 2005;10(6):412-26.
563. Goedert JJ, Cote TR, Virgo P, Scoppa SM, Kingma DW, Gail MH, et al. Spectrum of AIDS-associated malignant disorders. Lancet. 1998;351(9119):1833-9.
564. Kainerstorfer JM, Polizzotto MN, Uldrick TS, Rahman R, Hassan M, Najafizadeh L, et al. Evaluation of non-invasive multispectral imaging as a tool for measuring the effect of systemic therapy in Kaposi sarcoma. PLoS One. 2013;8(12):e83887.
565. Mankia SK, Miller RF, Edwards SG, Ramsay A, Lee SM. The response of HIV-associated lymphadenopathic Kaposi sarcoma to highly active antiretroviral therapy evaluated by 18F-FDG PET/CT. Clin Nucl Med. 2012;37(7):692-3.
566. Morooka M, Ito K, Kubota K, Yanagisawa K, Teruya K, Hasuo K, et al. Usefulness of F-18 FDG PET/CT in a case of Kaposi sarcoma with an unexpected bone lesion. Clin Nucl Med. 2011;36(3):231-4.
567. Robinson A, Kardos M, Kimball AB. Physician Global Assessment (PGA) and Psoriasis Area and Severity Index (PASI): why do both? A systematic analysis of randomized controlled trials of biologic agents for moderate to severe plaque psoriasis. J Am Acad Dermatol. 2012;66(3):369-75.
568. O'Mahony D, Gandjbakche A, Hassan M, Vogel A, Yarchoan R. Imaging techniques for Kaposi's sarcoma. J HIV Ther. 2008;13(3):65-71.
569. Morooka M, Ito K, Kubota K, Minamimoto R, Shida Y, Hasuo K, et al. Whole-body 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography images before and after chemotherapy for Kaposi sarcoma and highly active antiretrovirus therapy. Jpn J Radiol. 2010;28(10):759-62.
570. Chanan-Khan AA, Swaika A, Paulus A, Kumar SK, Mikhael JR, Rajkumar SV, et al. Pomalidomide: the new immunomodulatory agent for the treatment of multiple myeloma. Blood Cancer J. 2013;3:e143.
571. Biomarkers Definitions Working G. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. Clin Pharmacol Ther. 2001;69(3):89-95.
572. Heckman-Stoddard BM. Oncology biomarkers: discovery, validation, and clinical use. Semin Oncol Nurs. 2012;28(2):93-8.
573. Patel RM, Goldblum JR, Hsi ED. Immunohistochemical detection of human herpes virus-8 latent nuclear antigen-1 is useful in the diagnosis of Kaposi sarcoma. Mod Pathol. 2004;17(4):456-60.
574. Pereira PF, Cuzzi T, Galhardo MC. Immunohistochemical detection of the latent nuclear antigen-1 of the human herpesvirus type 8 to differentiate cutaneous epidemic Kaposi sarcoma and its histological simulators. An Bras Dermatol. 2013;88(2):243-6.
575. Cheuk W, Wong KO, Wong CS, Dinkel JE, Ben-Dor D, Chan JK. Immunostaining for human herpesvirus 8 latent nuclear antigen-1 helps distinguish Kaposi sarcoma from its mimickers. Am J Clin Pathol. 2004;121(3):335-42.
576. Nagata N, Igari T, Shimbo T, Sekine K, Akiyama J, Hamada Y, et al. Diagnostic value of endothelial markers and HHV-8 staining in gastrointestinal Kaposi sarcoma and its difference in endoscopic tumor staging. World J Gastroenterol. 2013;19(23):3608-14.
577. Aoki Y, Yarchoan R, Wyvill K, Okamoto S, Little RF, Tosato G. Detection of viral interleukin-6 in Kaposi sarcoma-associated herpesvirus-linked disorders. Blood. 2001;97(7):2173-6.
578. Rosado FG, Itani DM, Coffin CM, Cates JM. Utility of immunohistochemical staining with FLI1, D2-40, CD31, and CD34 in the diagnosis of acquired immunodeficiency syndrome-related and non-acquired immunodeficiency syndrome-related Kaposi sarcoma. Arch Pathol Lab Med. 2012;136(3):301-4.
579. Kennedy MM, Biddolph S, Lucas SB, Howells DD, Picton S, McGee JO, et al. Cyclin D1 expression and HHV8 in Kaposi sarcoma. J Clin Pathol. 1999;52(8):569-73.
580. Don-Salu-Hewage AS, Chan SY, McAndrews KM, Chetram MA, Dawson MR, Bethea DA, et al. Cysteine (C)-x-C receptor 4 undergoes transportin 1-dependent nuclear localization and remains functional at the nucleus of metastatic prostate cancer cells. PLoS One. 2013;8(2):e57194.
581. Wang LH, Liu Q, Xu B, Chen W, Yang Q, Wang ZX, et al. Identification of nuclear localization sequence of CXCR4 in renal cell carcinoma by constructing expression plasmids of different deletants. Plasmid. 2010;63(1):68-72.
582. Szpakowska M, Fievez V, Arumugan K, van Nuland N, Schmit JC, Chevigne A. Function, diversity and therapeutic potential of the N-terminal domain of human chemokine receptors. Biochem Pharmacol. 2012;84(10):1366-80.
583. Martinez-Martin N, Viejo-Borbolla A, Martin R, Blanco S, Benovic JL, Thelen M, et al. Herpes simplex virus enhances chemokine function through modulation of receptor trafficking and oligomerization. Nat Commun. 2015;6:6163.
584. Qin L, Kufareva I, Holden LG, Wang C, Zheng Y, Zhao C, et al. Structural biology. Crystal structure of the chemokine receptor CXCR4 in complex with a viral chemokine. Science. 2015;347(6226):1117-22.
585. Ballestas ME, Kaye KM. The latency-associated nuclear antigen, a multifunctional protein central to Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency. Future Microbiol. 2011;6(12):1399-413.
586. Guo M, Cai C, Zhao G, Qiu X, Zhao H, Ma Q, et al. Hypoxia promotes migration and induces CXCR4 expression via HIF-1alpha activation in human osteosarcoma. PLoS One. 2014;9(3):e90518.

587. Liu H, Xue W, Ge G, Luo X, Li Y, Xiang H, et al. Hypoxic preconditioning advances CXCR4 and CXCR7 expression by activating HIF-1alpha in MSCs. Biochem Biophys Res Commun. 2010;401(4):509-15.
588. Hodak E, Hammel I, Feinmesser M, Zelinger A, Maron L, Sulkes J, et al. Differential expression of p53 and Ki-67 proteins in classic and iatrogenic Kaposi's sarcoma. Am J Dermatopathol. 1999;21(2):138-45.
589. Haupt HM, Stern JB, Multhaupt H, Newman HW. Argyrophilic nucleolar organizer regions and proliferating cell nuclear antigen/cyclin in Kaposi's sarcoma. Comparison with morphology and with immunoperoxidase staining for factor VIII-related antigen. Arch Pathol Lab Med. 1995;119(6):538-41.
590. Pyakurel P, Massambu C, Castanos-Velez E, Ericsson S, Kaaya E, Biberfeld P, et al. Human herpesvirus 8/Kaposi sarcoma herpesvirus cell association during evolution of Kaposi sarcoma. J Acquir Immune Defic Syndr. 2004;36(2):678-83.
591. Lu J, Verma SC, Murakami M, Cai Q, Kumar P, Xiao B, et al. Latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) upregulates survivin expression in KSHV-Associated B-lymphoma cells and contributes to their proliferation. J Virol. 2009;83(14):7129-41.
592. Cornali E, Zietz C, Benelli R, Weninger W, Masiello L, Breier G, et al. Vascular endothelial growth factor regulates angiogenesis and vascular permeability in Kaposi's sarcoma. Am J Pathol. 1996;149(6):1851-69.
593. Arasteh K, Hannah A. The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in AIDS-related Kaposi's sarcoma. Oncologist. 2000;5 Suppl 1:28-31.
594. Masood R, Cai J, Zheng T, Smith DL, Naidu Y, Gill PS. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is an autocrine growth factor for AIDS-Kaposi sarcoma. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997;94(3):979-84.
595. Ford PW, Hamden KE, Whitman AG, McCubrey JA, Akula SM. Vascular endothelial growth factor augments human herpesvirus-8 (HHV-8/KSHV) infection. Cancer Biol Ther. 2004;3(9):876-81.
596. Miyoshi K, Kohashi K, Fushimi F, Yamamoto H, Kishimoto J, Taguchi T, et al. Close correlation between CXCR4 and VEGF expression and frequent CXCR7 expression in rhabdomyosarcoma. Hum Pathol. 2014;45(9):1900-9.
597. Liang Z, Brooks J, Willard M, Liang K, Yoon Y, Kang S, et al. CXCR4/CXCL12 axis promotes VEGF-mediated tumor angiogenesis through Akt signaling pathway. Biochem Biophys Res Commun. 2007;359(3):716-22.
598. Lin L, Han MM, Wang F, Xu LL, Yu HX, Yang PY. CXCR7 stimulates MAPK signaling to regulate hepatocellular carcinoma progression. Cell Death Dis. 2014;5:e1488.
599. Zheng K, Li HY, Su XL, Wang XY, Tian T, Li F, et al. Chemokine receptor CXCR7 regulates the invasion, angiogenesis and tumor growth of human hepatocellular carcinoma cells. J Exp Clin Cancer Res. 2010;29:31.
600. Salcedo R, Wasserman K, Young HA, Grimm MC, Howard OM, Anver MR, et al. Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor induce expression of CXCR4 on human endothelial cells: In vivo neovascularization induced by stromal-derived factor-1alpha. Am J Pathol. 1999;154(4):1125-35.
601. Villalba S, Salvucci O, Aoki Y, De La Luz Sierra M, Gupta G, Davis D, et al. Serum inactivation contributes to the failure of stromal-derived factor-1 to block HIV-I infection in vivo. J Leukoc Biol. 2003;74(5):880-8.
602. McQuibban GA, Butler GS, Gong JH, Bendall L, Power C, Clark-Lewis I, et al. Matrix metalloproteinase activity inactivates the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1. J Biol Chem. 2001;276(47):43503-8.
603. Neuhaus J, Jacobs DR, Jr., Baker JV, Calmy A, Duprez D, La Rosa A, et al. Markers of inflammation, coagulation, and renal function are elevated in adults with HIV infection. J Infect Dis. 2010;201(12):1788-95.
604. Machado PR, Farias KJ, Genre J, Oliveira CJ, Guedes PM, da Fonseca BA. Disseminated Kaposi's sarcoma in patients with HIV infection correlates to high serum levels of IL-10. Viral Immunol. 2014;27(7):356-60.
605. Pestka S, Krause CD, Sarkar D, Walter MR, Shi Y, Fisher PB. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. Annu Rev Immunol. 2004;22:929-79.
606. Irons RD, Le AT. Dithiocarbamates and viral IL-10 collaborate in the immortalization and evasion of immune response in EBV-infected human B lymphocytes. Chem Biol Interact. 2008;172(1):81-92.
607. Kanno H, Naka N, Yasunaga Y, Iuchi K, Yamauchi S, Hashimoto M, et al. Production of the immunosuppressive cytokine interleukin-10 by Epstein-Barr-virus-expressing pyothorax-associated lymphoma: possible role in the development of overt lymphoma in immunocompetent hosts. Am J Pathol. 1997;150(1):349-57.
608. Galon J, Pages F, Marincola FM, Angell HK, Thurin M, Lugli A, et al. Cancer classification using the Immunoscore: a worldwide task force. J Transl Med. 2012;10:205.

Annexes

« La liberté commence où l'ignorance finit »

Victor Hugo

1) Article 3

Annexe 1

The relevance of the chemokine receptor ACKR3/CXCR7 on CXCL12-mediated effects in cancers with a focus on virus-related cancers

Freitas C, **Desnoyer A**, Meuris F, Bachelerie F, Balabanian K, Machelon V.

Cytokine Growth Factor Rev. 2014 Volume 25 Issue 3:307-16.
doi: 10.1016/j.cytogfr.2014.04.006, PMID: 24853339

Cytokine & Growth Factor Reviews 25 (2014) 307–316

Contents lists available at ScienceDirect

Cytokine & Growth Factor Reviews

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cytogfr

Mini review

The relevance of the chemokine receptor ACKR3/CXCR7 on CXCL12-mediated effects in cancers with a focus on virus-related cancers

Christelle Freitas [a,b], Aude Desnoyer [a,b,1], Floriane Meuris [a,b,1], Françoise Bachelerie [a,b], Karl Balabanian [a,b,*], Véronique Machelon [a,b,**]

[a] Univ. Paris-Sud, Laboratoire "Cytokines, Chemokines and Immunopathology", UMR_S996, 32, rue des Carnets, Clamart F-92140, France
[b] INSERM, Univ. Paris-Sud, Laboratory of Excellence in Research on Medication and Innovative Therapeutics (LERMIT), Clamart F-92140, France

ARTICLE INFO

Article history:
Available online 9 May 2014

Keywords:
Cancer
Virus
ACKR3/CXCR7
CXCL12/SDF-1
CXCR4

ABSTRACT

Recent studies have highlighted the importance of understanding the molecular determinants of CXCL12-mediated effects in cancers. Once previously thought to interact exclusively with CXCR4, CXCL12 also binds with high affinity to CXCR7 (recently renamed ACKR3), which belongs to an atypical chemokine receptor family whose members fail to activate $G_{\alpha i}$ proteins but interact with β-arrestins. In addition to its capacity to control CXCL12 bioavailability, ACKR3 can either enhance or dampen CXCR4-mediated signaling and activity. In light of the most recent findings, we have examined the role of ACKR3 in cancer, including a subset of virus-related cancers.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Chemokines are small proteins that are major regulators of cellular trafficking and play key roles in the differentiation and functions of various tissues in vertebrates. Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1), also called chemokine (C-X-C motif) ligand 12 (CXCL12), is widely expressed throughout many tissues. CXCL12 is secreted by bone marrow (BM) stromal cells, endothelial cells, heart, skeletal muscle, liver, brain, kidney parenchymal cells, and osteoblasts [1]. It serves as a potent chemoattractant for immature and mature hematopoietic cells and plays an essential role in stem cell proliferation, survival, and homing to the BM [2]. It also plays a prominent role in carcinogenesis, largely because the metastatic process is very similar to the "homing" behavior of hematopoietic stem cells to the BM. In many cancers, CXCL12 regulates the trafficking of malignant cells that promotes invasion of local tissues and tumor metastasis. By recruiting endothelial progenitor cells (EPCs) from the BM, CXCL12 also regulates the angiogenesis linked to tumor progression [3]. In addition to its chemotactic functions, CXCL12 has also been shown to regulate tumor cell proliferation, motility, and survival [4].

Chemokines exert their functional effects by binding to G protein-coupled seven-span transmembrane receptors (GPCRs). CXCR4 was the first CXCL12 receptor identified and is overexpressed in at least 20 different human cancers. The association between CXCL12/CXCR4 and cancer is quite extensive, making the CXCL12/CXCR4 axis one of the most attractive therapeutic targets in oncology [4]. A second receptor for CXCL12, CXCR7, was identified in 2005. CXCR7 had been previously known as receptor dog cDNA 1 (RDC-1) but was recently renamed atypical chemokine receptor 3 (ACKR3), and we will hereafter refer to it as such [5–7]. ACKR3 is widely expressed in the hematopoietic system, heart, vascular endothelial cells, bone, kidney, and brain [7]. Collectively, its functions are complex. ACKR3 has a dedicated role in fetal cardiac development, as elucidated in *ACKR3*-deficient mice [8]. Both CXCR4 and ACKR3 are expressed in a number of cancers, which raises several questions about the contribution of ACKR3 in processes previously attributed only to CXCL12/CXCR4 interactions. Defining the role of ACKR3 in CXCL12-mediated actions in tumors is a current priority in the search for new chemotherapeutic targets in the treatment of cancers. In this review, we examine how ACKR3 can control the bioavailability of CXCL12 in the tumoral microenvironment and how it interacts with CXCR4. We discuss the

* Corresponding author at: Inserm UMR-S 996, Univ. Paris-Sud, LabEx LERMIT, 32 rue des Carnets, Clamart F-92140, France. Tel.: +33 141288003.
** Corresponding author at: Inserm UMR-S 996, Univ. Paris-Sud, LabEx LERMIT, 32 rue des Carnets, Clamart F-92140, France.
E-mail addresses: karl.balabanian@u-psud.fr (K. Balabanian), veronique.machelon@u-psud.fr (V. Machelon).
[1] These authors contributed equally to this work.

http://dx.doi.org/10.1016/j.cytogfr.2014.04.006
1359-6101/© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

role of ACKR3 in cancer proliferation, angiogenesis, and metastasis, with a focus on virus-related cancers, these later one are lacking comprehensive review. Considering all current findings, we discuss the potential of ACKR3 as a promising target for anti-tumor therapies.

2. ACKR3 in physiology

2.1. An atypical GPCR

ACKR3 is highly conserved among mammalian species, as revealed from comparisons of human, dog, mouse and rat *ACKR3* gene sequences [9]. The original *RDC-1* cDNA was first cloned from a dog thyroid cDNA library on the basis of its homology with the conserved domains of GPCRs. Considered for many years as an orphan receptor, combined phylogenetic and chromosomal location studies suggested that RDC-1 was a chemokine receptor (CKR) structurally similar to CXC receptors [10,11]. RDC-1 was thus renamed CXCR7 in 2005, but more recently, the ACKR3 name was formally recognized by the Nomenclature Committee of the International Union of Pharmacology and the Human Genome Organization Gene Nomenclature Committee [5–7]. Like CXCR4, ACKR3 binds CXCL12 but with a 10-fold higher affinity [5,6]. ACKR3 also binds CXCL11 (IFN-inducible T cell alpha chemoattractant), albeit with an affinity lower than its affinity for CXCL12. Unlike CXCR4, which belongs to the GPCR family and signals by activating $G_{\alpha i}$-type G proteins, ACKR3 belongs to the atypical CKR group, which is characterized by receptors that have the capacity to scavenge chemokines in a G protein-independent but β-arrestin-dependent fashion. The GPCR amino acid sequence motif, DRYLAIV, which is located in the second intracellular loop and is crucial for $G_{\alpha i}$ protein coupling and calcium signaling, is notably lacking in ACKR3. Instead, ACKR3 harbors a DRYLSIT motif, which strongly suggests that this structural difference contributes to ACKR3's inability to relay intracellular signals through $G_{\alpha i}$ [12].

In contrast to CXCR4, ACKR3 continuously cycles between the plasma membrane and endosomal compartments [13]. Indeed, in the case of CXCR4, GPCR kinases (GRKs) phosphorylate Ser/Thr residues at its C-terminal tail, which leads to β-arrestin 2 recruitment and subsequent internalization of receptors after CXCL12 exposure [14,15]. In contrast, ACKR3 lacks these Ser/Thr clusters, which leads to a dynamic interaction with the β-arrestins and rapid recycling of the receptor [16]. Further, the ubiquitination process is also differentially implicated in the trafficking control of these two receptors (Fig. 1). CXCR4 trafficking to the lysosomes and its subsequent degradation strongly depends on ubiquitination of lysine residues in its C-terminal domain [16–19]. In contrast, ACKR3 is constitutively ubiquitinated in the absence of ligand and this process is required for ACKR3 membrane localization [16]. ACKR3 deubiquitination occurs following agonist binding and is associated with chemokine degradation in early endosomes and β-arrestin release. This process allows ACKR3 to bind ubiquitin and recycle back to the cell surface. Thus, although both CXCR4 and ACKR3 bind CXCL12, accumulating evidence indicates that they function in quite different ways. Far from being a "silent" receptor, ACKR3 can signal and act as a β-arrestin-biased receptor resulting in activation of extracellular signal-regulated kinases (ERKs) or Protein Kinase B (PKB or Akt) [20–22]. However, the precise molecular pathway for ACKR3 signaling still remains to be clearly established.

2.2. Impact of ACKR3 on CXCL12 bioavailability

At least two processes involving ACKR3 may modulate CXCL12 bioavailability. ACKR3 can scavenge CXCL12, thus removing it from the extracellular environment, or modulate the balance between monomeric and dimeric forms of CXCL12 [23,24].

2.2.1. CXCL12 scavenging

Growing evidence indicates that ACKR3 exhibits characteristics of a chemokine-scavenging receptor [21]. This includes its constant ligand-independent cycling between the plasma membrane and intracellular compartments and its non-saturating binding of CXCL12 [25]. Through this process, the receptor may clear CXCL12 from the extracellular environment, as was first demonstrated to occur during zebrafish embryo development. In the stromal environment, ACKR3 controls CXCR4-mediated migration of primordial germ cells by sequestering extracellular CXCL12 and, hence, shaping the extracellular CK gradient [23]. In humans, it was proposed that the expression of ACKR3 in endothelium might regulate circulating CXCL12 levels [26]. In developmental models, ACKR3 is able to prevent internalization and degradation of CXCR4 in kidney and neurons, thereby maintaining CXCL12/CXCR4 signaling. Indeed, CXCR4 internalization is increased in *ACKR3*-deficient kidney due to a lack of CXCL12 scavenging [27]. Furthermore, ACKR3 is necessary for regulating CXCR4 expression in the specifying migration of interneurons [28]. It has been recently reported that activation of ACKR3 with specific agonists reduced the level of CXCR4 protein [29]. Given ACKR3's 10-fold higher affinity for CXCL12 [5], the co-expression of ACKR3 with CXCR4 in the same cell may result in the sequestration of CXCL12 from the microenvironment rather than its binding to CXCR4. Mechanisms that alter the overall availability, distribution, and gradients of CXCL12 in tumor microenvironments should, in principle, regulate the functions of CXCR4 in tumor growth and metastasis.

2.2.2. Monomeric and dimeric CXCL12 balance

Recent data suggest that CXCL12 is secreted as both monomers and dimers [24]. The two forms may have distinct roles, but their respective actions have not yet been completely elucidated. The CXCL12 monomer/dimer balance is controlled by various factors such as basic pH, the presence of multivalent anions and high concentration of glycosaminoglycans (GAGs) at the cell surface which favor formation of the dimeric form [30]. ACKR3 is also one of such factor, because it has been proposed to preferentially sequester monomeric CXCL12 [24] thus increasing the proportion of dimeric CXCL12 in the microenvironment (Fig. 2). Monomeric and dimeric CXCL12 can signal *via* CXCR4, although their respective contribution to CXCL12-mediated chemotaxis still remains to be fully elucidated [31].

2.3. ACKR3 and CXCR4 interactions

One of ACKR3's major roles is to modulate CXCR4 expression and function [32]. Whether ACKR3 activates or impairs CXCR4 effects depends on the final outcome of their crosstalk. Although GPCRs were previously assumed to act as monomers, recent structural and computational modeling studies have revealed that GPCRs such as CXCR4 can form homodimers and heterodimers, either constitutively or upon ligand binding. GPCR dimer structures have been extensively studied through crystal structure analysis, which can be used to predict the dimerization of the receptor that determines its biological activity and pharmacological effects *in vivo* [33]. Studies of CXCR4 homodimers in transfected cell lines have shown that these dimers preferentially couple with pertussis toxin-sensitive $G_{\alpha i}$ proteins [34,35]. However, CXCR4 may also interact physically with other CKRs including ACKR3. Putative CXCR4/ACKR3 heterodimers have been proposed to be important regulators of ligand-dependent signaling [36]. Indeed, the formation of functional heterodimers has been demonstrated using bioluminescence resonance energy transfer assays [8,34,37]. Dimerization may result in the recruitment of β-arrestin to the CXCR4/ACKR3 complex (Fig. 3). Another critical ACKR3 interaction is that it can activate or impair CXCR4 signaling. Hartmann and

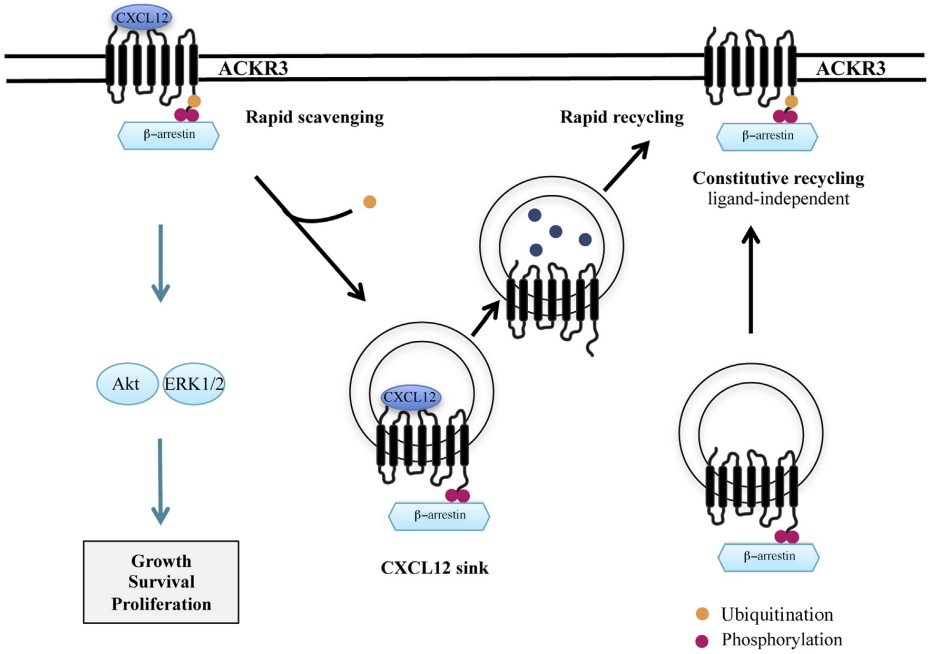


Fig. 1. ACKR3 activity regulation. CXCL12 binding to ACKR3 promotes growth, survival and proliferation *via* β-arrestin pathways. After CXCL12 binding, ACKR3 either recycles to the cell membrane or scavenges CXCL12 into an intracellular compartment. Constitutive ACKR3 recycling is independent of CXCL12 binding.

collaborators have recently reported that ACKR3 may regulate the CXCR4-dependent rapid integrin activation and the adhesion of T cells to endothelial cells [38].

3. ACKR3 in carcinogenesis

3.1. Overexpression of ACKR3 in cancers

ACKR3 is widely expressed in many normal tissues including heart, brain, spleen, kidney, lungs, testes, ovary, thyroid, and human placenta. However, like many other CKRs including CXCR4, ACKR3 is also expressed in a large number of cancers including breast, lung, cervical, pancreatic, myeloid, glial and prostate cancers. Notably, higher levels of ACKR3 expression are frequently found in tumor tissues compared to their healthy counterparts, but the effects of ACKR3 overexpression vary according to cancer type (Table 1). For instance, ACKR3 expression levels are much higher and more frequently found in astrocytoma and glioblastoma tumors than in normal brain tissue. Further, the levels of *ACKR3* transcripts are higher in astrocytoma and glioblastoma cells than in normal ones [39]. ACKR3 is moderately expressed in normal vasculature whereas high levels of ACKR3 expression in tumor vessels are a common feature of many cancers including breast and lung carcinomas [40]. Hence, the presence of ACKR3 proteins on tumor endothelial cell surfaces has been proposed as a marker of tumor vasculature [39,41].

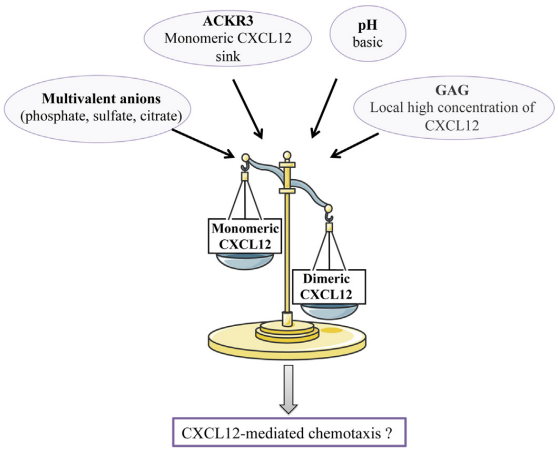


Fig. 2. CXCL12 oligomerization. The balance between monomers and dimers depends on local concentration of glycosaminoglycans (GAG), pH, presence of multivalent anions in the extracellular microenvironment and on ACKR3 cellular expression. Their respective role in CXCL12-mediated chemotaxis still remains to be defined.

3.2. Factors controlling ACKR3 expression in cancers

Features distinctive of the tumor microenvironment are known to control ACKR3 expression. For instance, hypoxic conditions increase the levels of *ACKR3* transcripts in human microvascular endothelial cells and of ACKR3 proteins in glioma cell lines [42,43]. Accordingly, hypoxia-inducible factor 1 alpha has been shown to increase *ACKR3* transcript levels in mesenchymal stem cells [44]. DNA methylation can silence tumor suppressor genes and is a component of tumorigenesis in a variety of cancers. Recently, the hypermethylated in cancer 1 (HIC1) tumor suppressor has been implicated in the transcriptional regulation of *ACKR3* [45]. For instance, the *ACKR3* promoter is negatively regulated by HIC1 in prostate cancer cells [46]. MicroRNAs, (miRNAs), which are small non-protein-coding RNAs that repress target messenger RNAs by binding to their 3′-untranslated regions, were recently shown to be involved in the development of numerous types of malignant tumors. MiRNA-430 modulates the

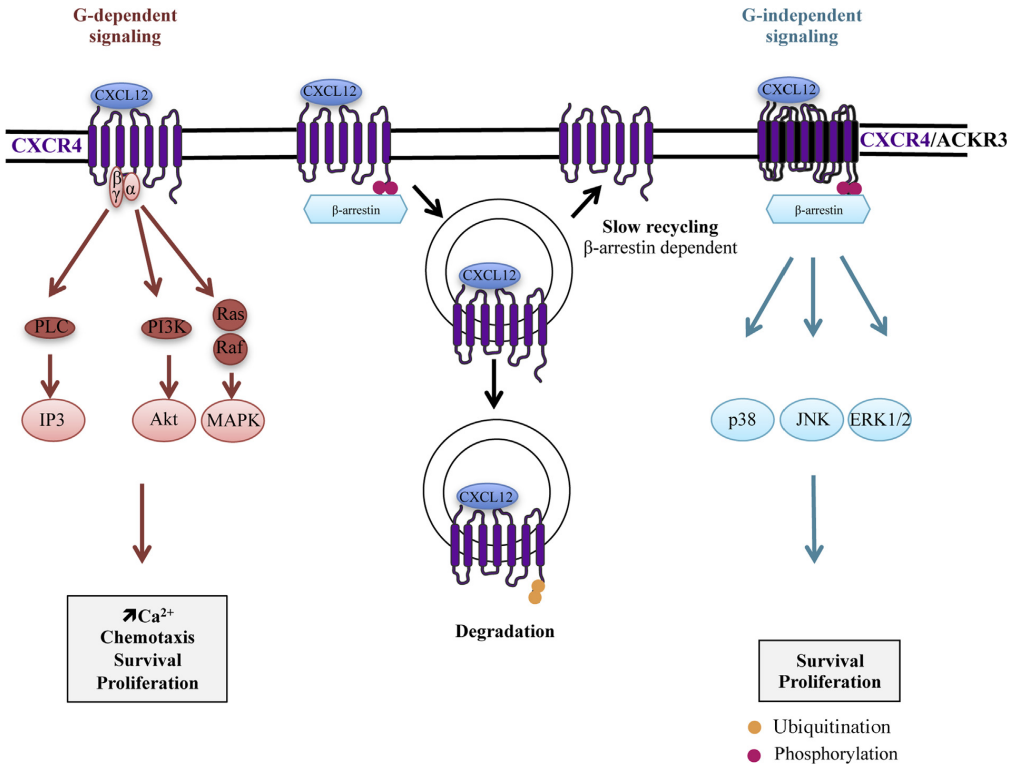


Fig. 3. Heterodimerization of CXCL12 receptors. CXCR4 and ACKR3 can form heterodimers. CXCL12 stimulation can promote a switch from canonical G protein-dependent transmission induced by CXCR4 activation to a biased β-arrestin-dependent pathway that promote p38, JNK, and ERK1/2 activation.

levels of *Ackr3* in zebrafish, suggesting that a loss of miRNA-mediated regulation can result in ACKR3 overexpression [47]. Accordingly, high levels of ACKR3 expression in a bladder cancer cell line correlated with the downregulation of miRNA-430 [48]. Further, restoring the expression of miRNA-101, an important tumor-suppressive miRNA, suppresses ACKR3 protein synthesis in primary hepatocytes, normal hepatocyte-derived cell lines, various hepatocellular carcinoma cell lines, and xenograft mice models [49].

3.3. Impact of ACKR3 on CXCL12 bioavailability in cancers

CXCL12 is produced by cells in the environment of many tumors and its extracellular bioavailability can be regulated by CXCR4 and

Table 1
ACKR3 impact in various cancers.

Cancer	Biological/clinical effects	Publications
Prostate	Proliferation, tumor growth, increased expression of proangiogenic factors IL-8/CXCL8 VEGF	Wang J et al., 2008; Singh et al., 2011
Breast	Growth/survival, proliferation, metastases (lung, brain)	Burns JM et al., 2006; Miao et al., 2007
Liver	Metastases	Guillemot et al., 2012
Lung	Growth, metastases	Miao et al., 2007; Burns et al., 2006; Iwakiri et al., 2009
Pancreatic adenocarcinoma	Proliferation	Marechal et al., 2009
Brain tumor	Glioma progression	Hattermann et al., 2012
Hepatocellular carcinomas	Angiogenesis, invasion and metastasis, tumor growth	Zheng K et al., 2010; Xue TC et al., 2013
Bladder cancer	Expression of pro-angiogenic factors CXCL8, VEGF, survival, proliferation, migration	Hao M et al., 2012; Yates TJ et al., 2012; Liu et al., 2013
Cervical cancer	Aggressive tumor growth and metastasis formation, poor survival	M Schrevel et al., 2012
Rhabdomyosarcoma	Chemotaxis	Grymula et al., 2010
Kidney	Angiogenesis, metastasis	Maishi N et al., 2012; Gahan JC et al., 2012
Colorectal	Proliferation, tumor size, metastasis	Xu H et al., 2011
Neuroblastoma	Migration, metastasis	Ma M et al., 2011
Oral squamous cell carcinoma	Carcinogenesis	Xia J et al., 2011
Meningioma	Vascularization, proliferation	Würth R et al., 2011
Gliomas	Proliferation, modulates cell migration	Calatozzolo C et al., 2011; Esencay M et al., 2013
Gastric MALT lymphoma	Associated with nodal manifestation and a more advanced stage of lymphomas	Deutsch AJ et al., 2012
Leukemia	Trafficking/adhesion	Tarnowski M et al., 2010

ACKR3 on the cell surface. In support of this concept, *in vivo* imaging has shown that malignant cells expressing ACKR3 reduced the concentration of secreted bioluminescent-CXCL12 in the primary tumor microenvironment [50]. The initial view that the primary function of ACKR3 is to control the bioavailability of CXCL12 has been widely reevaluated, after the distinctive properties of ACKR3 as a β-arrestin-biased GPCR have been highlighted.

Dimeric and monomeric CXCL12 elicit different effects, especially in CXCR4 signaling and chemotaxis. In cancers, the dimeric form can induce opposing effects depending on the type of tumor. For example, in an orthotopic tumor xenograft model of human breast cancer, dimeric CXCL12 promotes β-arrestin 2 recruitment and a chemoattractive activity more potent than monomeric CXCL12 [24]. In contrast, in a human colon carcinoma cell line, the monomeric CXCL12 form promotes cell migration, intracellular calcium mobilization, β-arrestin 2 recruitment, whereas the dimeric form only weakly promotes β-arrestin 2 recruitment and chemotaxis [51]. However, both forms of CXCL12 inhibit metastasis in a mouse model of colorectal carcinoma [51]. In conclusion, the respective and often opposing actions of monomeric and dimeric CXCL12 forms in tumors remain to be clarified.

3.4. Relationship between CXCR4 and ACKR3 in cancers

ACKR3 is expressed by malignant cells in a number of human tumors but also by cells in the tumor microenvironment such as in the tumor-associated blood vessels [40] and in microglial cells in glioblastoma [43]. It may or may not be co-expressed with CXCR4 according to tumor type. CXCR4 and ACKR3 may be expressed on distinctive tumor cell populations such as in breast cancer [50] and in glioma [39]. At the opposite, in human pancreatic cancer tissues the two receptors are frequently coexpressed on the same cells [52]. The expression of the receptors on distinctive cell populations limits their action to paracrine regulation, whereas the expression of both receptors on a single cell population allows direct interactions between the two receptors or reciprocal control of their signaling pathways.

The presence of both CXCR4 and ACKR3 on the same cells alters CXCL12-induced chemotactic function. For instance, the CXCL12-induced chemotactic response is potentiated in breast cancer cell line MDA-MB-231 transfected with increasing amounts of ACKR3 [35]. Further, in the rat mammary adenocarcinoma cell line MTLn3, in the context of increased CXCR4 expression, CXCR7 enhanced chemotaxis to CXCL12 [53]. At the opposite, in human neuroblastoma cell lines, CXCR7 impaired CXCR4/CXCL12-mediated chemotaxis [54]. The signal that results from receptor activation by CXCL12 in cells coexpressing both receptors may occur after the two receptors physically associate to form heterodimers that may convert signals into β-arrestin-dependent pathways [37].

3.5. ACKR3 in angiogenesis and metastasis

Transendothelial migration controls the dissemination of EPCs, which is a key element in promoting angiogenesis, and the metastatic dissemination of malignant cells from a primary tumor to distant organs. ACKR3 is highly expressed in EPCs. It controls the survival effect of CXCL12 on EPCs and is implicated in CXCL12-mediated adhesion, transendothelial migration, proliferation, and tube formation of EPCs [55]. Elevated expression of ACKR3 in tumor endothelial cells supports an angiogenic role for this receptor in cancers. Besides its role in transendothelial migration, ACKR3 is involved in a number of actions that control the angiogenic process. In response to hypoxic conditions, VEGF and CXCL8 are abundantly produced in the tumor microenvironment, resulting in a positive feedback that further amplifies ACKR3 expression [41,56,57]. In breast cancer, ACKR3 activation stimulates VEGF production and microvessel density that can stimulate primary tumor growth [53]. In hepatocellular carcinoma, ACKR3 activity regulates angiogenesis and tumor growth *via* enhanced endothelial cell proliferation, migration and VEGF production [58]. Recent studies have highlighted the role of ACKR3 in head and neck tumor angiogenesis and the clinical importance of the ACKR3 antagonists to inhibit tumor growth [59]. In osteosarcoma and associated lung metastasis, ACKR3 is mainly expressed on tumor-associated vessels that confer a critical role for this CKR in the metastatic process [60]. To summarize, most recent studies have revealed an angiogenic effect of ACKR3 resulting from its actions on transendothelial migration of EPCs, and in the survival and proliferation of endothelial cells *via* the production of angiogenic factors such as VEGF and CXCL8.

The capacity of ACKR3 to directly promote migration following CXCL12 binding is uncertain. Thus, ACKR3 has not been implicated in the CXCL12-mediated metastatic behavior of non-small lung cancer cells [61]. Nevertheless, ACKR3 can modulate CXCL12 effects mediated by CXCR4 known to promote metastasis. In some cases, ACKR3 can decrease CXCR4-mediated effects. In an immunodeficient mouse model of breast cancer, ACKR3 limits tumor cell invasion by downregulating metalloproteinase-12 production, impairing CXCL12-stimulated matrix degradation and invasion, and decreasing spontaneous lung metastasis formation [53]. It has been also proposed that ACKR3 regulates CXCR4-mediated transendothelial migration of human tumor cells toward a CXCL12 source [62,63]. At the opposite, ACKR3 activation has been reported to promote metastasis in a breast cancer model [40] and to increase the risk of extrahepatic metastasis through upregulation of osteopontin in hepatocellular carcinoma [64].

Although ACKR3 can enhance the transendothelial migration of EPCs, its action on migration of tumor cells is less clear, as it may either synergize with or impair CXCR4 action.

3.6. ACKR3 in virus-related cancers

Although little is known so far, some viruses appear to be associated with ACKR3 receptor dysfunction. This section of the review will focus on HTLV1 (human T lymphotropic virus type 1), EBV (Epstein–Barr virus), HHV8 (human herpes virus 8), and HPVs (human papillomaviruses), all of which are cancer-related viruses suspected to be involved with ACKR3 and the ones that have been the most studied. The findings highlight a role for ACKR3 in the control of cell survival and adhesion [65], both of which can be modified by infection with certain potentially oncogenic viruses, thus shifting the infection toward transformation.

3.6.1. HTLV-1

HTLV-1 is an oncogenic retrovirus that establishes a persistent infection in humans and is associated with malignancies such as myelopathy or adult T-cell leukemia, a disease of mature T cells [66]. It encodes the essential regulatory protein Tax, which is responsible for enhancing viral gene expression and replication and for contributing to HTLV-1-mediated T cell transformation. Jin et al. have reported that ACKR3 is also a HTLV-1 target and have identified Tax as a transcriptional inducer of *ACKR3* expression through NF-κB induction. Expression of ACKR3 promotes growth and survival of adult T-cell leukemia cell lines suggesting a contribution of the receptor in HTLV-1-induced immortalization of T cells [67].

3.6.2. EBV

The Herpesviridae family includes eight members known to infect humans: EBV, cytomegalovirus, herpes simplex viruses

1 and 2, varicella-zoster virus, and human herpesviruses 6, 7, and 8. All cause latent infection and can reactivate lytic replication under certain conditions, and at least two are known to be oncogenic: EBV and HHV-8. Notably, ACKR3 has been implicated in the pathogenesis of both viruses.

EBV is a B-cell-tropic double-stranded DNA virus, which belongs to the Gammaherpesvirus subfamily. More than 90% of the global adult population has been infected with EBV. It is a frequent cause of infectious mononucleosis, though infection is most often asymptomatic. In some rare cases, EBV infection may be associated with lymphoid tumors such as Burkitt's lymphoma, Hodgkin's lymphoma and B-cell lymphoproliferative disease in immunocompromised patients [68]. The scarcity of these pathogenic outcomes suggests that viral as well as cellular factors contribute to its tumorigenesis.

Viral factors include the *EBNA2* (EBV nuclear antigen 2) gene, which is the basis for the EBV type 1 (T1) and type 2 (T2) strain classifications. The EBNA2 protein is a key determinant in the virus-associated B-cell growth transformation process and is a transcription factor for viral and some cellular genes [69].

Maier et al. were the first to report a relationship between EBV and ACKR3. This was discovered following analyses of cellular gene arrays from EBV-negative cell lines in which EBNA2 was ectopically expressed. *ACKR3* was one of the 197 transcripts upregulated by EBNA2 [70]. These results were extended to an EBV-transformed B cell line where it was demonstrated that *ACKR3* was the gene most strongly induced by EBNA2 [71]. Later, Lucchesi et al. compared the cellular gene induction capabilities of EBNA2 T1 and T2 [72]. They confirmed *ACKR3* induction by EBNA2 and discovered that EBNA2 T1 was a stronger inducer than EBNA2 T2. This differential regulation, together with the fact that ACKR3 is required for proliferation and survival of lymphoblastoid cell lines, is consistent with the greater ability of EBV T1 strains to immortalize primary human B cells *in vitro* [72,73]. In support of this concept, the functional differences between EBNA2 T1 and T2 were traced to the C-terminus region of the protein, the substitution of which was sufficient to confer an EBNA2 T1-type growth phenotype and *ACKR3* expression pattern to EBNA2 T2 [74].

EBV also appears to impact the expression of CXCL12 and CXCR4. EBV has been shown to induce CXCL12 upregulation *in vitro* and to have discordant effects on CXCR4 expression, which depended on the EBV protein present in the cells [75,76]. *In vivo*, CXCL12 and CXCR4 were found to be overexpressed in primary EBV positive nasopharyngeal carcinoma [77].

3.6.3. HHV-8

ACKR3 is also implicated in the pathophysiology of another oncogenic herpesvirus, HHV-8. This Gammaherpesvirus is also known as Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus and, like EBV, it has a tropism for B cells, monocytes, and endothelial cells. HHV-8 can also cause tumors, such as Kaposi's sarcoma (KS), which manifests initially as cutaneous lesions. It is also associated with lymphoproliferative disorders and lymphomas in persistently infected patients. These cancers occur most frequently in the context of immunosuppression, such as in human immunodeficiency virus (HIV) infection [78].

The upregulation of *ACKR3* by HHV-8 was first reported in 2002 by two groups systems to compare gene expression in HHV-8-infected and -uninfected life-extended dermal microvascular endothelial cells (DMVEC) [79,80]. Both studies reported a strong upregulation of *ACKR3* expression by HHV-8. Consistent with these early results, small interfering RNAs or antisense molecules directed against *ACKR3* inhibited proliferation and foci formation in HHV-8-infected DMVEC [81]. Moreover, ectopic expression of ACKR3 increased cell proliferation. These findings suggest that ACKR3 plays a key role in focus formation and proliferation of HHV-8-infected cells. In addition, *ACKR3*-transfected mouse embryonic fibroblast cell line NIH 3T3 formed tumors in nude mice, further suggesting that ACKR3 plays a major and direct role in KS tumorigenesis. This idea is further supported by the observation that CXCL12, which is constitutively expressed in endothelial and dendritic cells in normal skin, is upregulated in KS lesions [82]. Although HHV-8 was shown to modulate the expression of CXCR4, other studies have yielded conflicting results [83–85].

The oncogenic mechanisms of HHV-8 in the KS microenvironment remain unknown. Determining whether ACKR3 is upregulated in KS and plays a role in KS pathology, and whether HIV infection alters ACKR3 expression in KS, could yield important clues in the development of treatment strategies.

3.6.4. HPV

HPVs are double-stranded DNA viruses with a tropism for malpighian epithelia and more selectively for keratinocytes. HPV infection is very common and frequently asymptomatic. It may also manifest as cutaneous warts and mucosal lesions, but can in rare cases progress to cancer with certain HPV types (*e.g.*, cervical cancers and oropharyngeal cancers are associated with several high-risk viruses) [86]. More than 80% of women are considered to have been infected at least once although less than 1% develop a pathology [87]. The host factors that contribute to the diverse fates of HPVs infection remain quite unknown. The evidence for a role of the CXCL12-dependent axis in HPV pathogenesis arose from observations made in the context of the WHIM syndrome (WS). WS is a rare immunodeficiency disorder characterized by a high susceptibility to HPV infection (*e.g.*, persistent warts and a high prevalence of genital cancer), hypogammaglobulinemia, frequent infections, myelokathexis (BM retention of senescent neutrophils), and circulating leukopenia. WS is caused by CXCL12-dependent axis dysfunctions, mainly as a consequence of inherited heterozygous autosomal dominant gain-of-function mutations in the *CXCR4* gene [88]. In warts and condylomas from WS patients, we unraveled the abnormal expression of CXCL12 and extended our findings to HPV-induced lesions regardless of whether patients suffer from WS [89]. These results support the existence of a more general interplay between the HPV life cycle and the CXCL12-dependent axis. In a subsequent study, we found that CXCL12, CXCR4, and ACKR3 expression increased in human primary keratinocytes immortalized with two high-risk HPVs (HPV16 and HPV18) as a consequence of E6 and E7 viral oncogene expression. This activated CXCL12/CXCR4/ACKR3 trio triggered an autocrine signaling pathway that resulted in the constitutive activation of the Akt protein kinase. This chain of events occurred mainly through ACKR3 activity, which is known to be essential for keratinocyte proliferation and migration. This interplay is exploited by the gain of CXCR4 function in WS and confers HPV-immortalized keratinocytes with transforming capacity *in vivo* [90]. The CXCL12 signaling axis was also reported to stimulate the invasion potential of circulating HPV-positive tumor cells through the activation of the Rho/ROCK pathway [91]. Beyond KS and HPV-induced pathogenesis, additional findings suggest a role for this signaling axis in other skin pathologies – especially psoriasis, skin wound healing, and basal cell carcinoma tumor angiogenesis [92]. Collectively these results raise the possibility that CXCL12 and its receptors CXCR4/ACKR3 are therapeutic targets for skin malignancies.

Although the role of ACKR3 in virus-related cancers has not been extensively studied, existing evidence suggest that these viruses commonly induce ACKR3 upregulation through the expression of viral oncogenes (Tax, EBNA2, E6/E7). In these cancers, ACKR3 expression seems to be associated with cell growth, transformation and survival. ACKR3 likely plays a direct

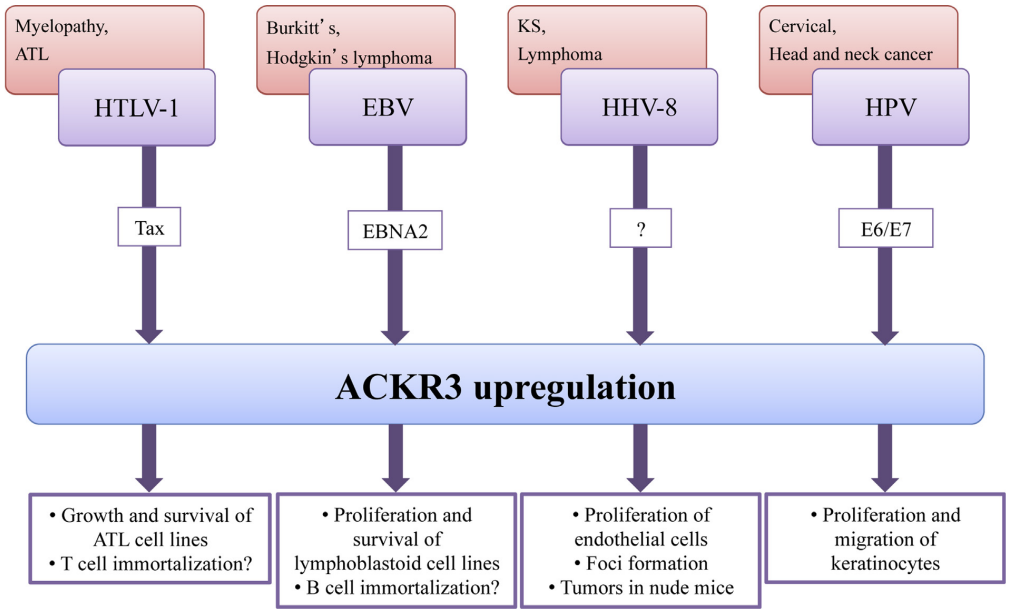


Fig. 4. HTLV-1, EBV, HHV-8 and HPV are oncoviruses that affect ACKR3 expression. Through the expression of their respective viral proteins Tax, EBNA2, unknown proteins and E6/E7, these viruses upregulate ACKR3 leading to increased cell growth, proliferation, survival, and eventually transformation.

role in tumorigenesis, but more studies are needed to confirm that ACKR3 contributes to virus-related carcinogenesis *in vivo* (Fig. 4).

4. Conclusion and perspectives

CXCL12 and its receptors have been demonstrated to play key roles in cancer including some virus-related cancers. Their action on angiogenesis, proliferation, protection from the host response, and dissemination of tumor cells through endothelia may result from direct physical interactions between the two receptors or *via* interconnected signaling pathways. Cancer treatments targeting this axis may be focused on blocking the activity of CXCL12 or its receptors. Blocking CXCL12 could be accomplished with humanized antibodies or small molecule inhibitors [93,94]. One alternative is to target the receptors themselves. GPCRs are the most commonly targeted receptor class for therapeutics and intense efforts have been made to identify therapeutic agents that specifically target CXCR4 or ACKR3. The most well-characterized small molecule CXCR4 antagonist, AMD3100 (Plerixaflor/Mozobil®), has been approved by the US Food and Drug Administration for use in combination with G-CSF to induce the mobilization of human hematopoietic stem cells [95]. AMD3100 also blocks growth of some tumor cell lines, suggesting that it has additional therapeutic potential. Moreover, other CXCR4 antagonists are under investigation for preventing metastases [96]. In a number of virus-related and -unrelated cancers, ACKR3 overexpression is associated with tumorigenesis. Due to its role in tumor progression, ACKR3 is also a potential therapeutic target in the treatment of tumors, and ACKR3 antagonists/inhibitors are currently being investigated. Of interest, TC14012 and AMD3100 are two structurally unrelated CXCR4 antagonists found to be ACKR3 agonists [97,98]. Novel ACKR3 ligands have also been developed using an optimized GPCR structure modeling method [99]. Moreover, several ACKR3 antagonists have been developed to prevent metastasis, as suggested by the efficacy of the selective antagonist, CCX733, in bladder cancer models [100]. ACKR3 can also be targeted by nanobody inhibitors, which are llama-derived immunoglobulin single variable domains that have shown promise in animal models of head and neck cancer [59]. The expected effects of ACKR3 inhibitors are likely to differ according to intratumoral CXCL12 production or to the extent of ACKR3 and CXCR4 co-expression in a same cell. Factors that determine the intracellular routes of CXCL12 and the consequent biological responses will be of central importance in the identification of therapeutics that target the CXCL12 axis. Up to now these factors are not completely understood but further research should yield the tools necessary to develop more effective and specific cancer therapies that target the CXCL12/CXCR4/ACKR3 axis.

Conflict of interest

The authors have no conflicting financial interests.

Acknowledgements

This work was supported by Agence Nationale de la Recherche grant 2010-JCJC-110401 to KB. CF, AD, FM, FB, KB, and VM are members of the Laboratory of Excellence in Research on Medication and Innovative Therapeutics supported by ANR grant ANR-10-LABX-33 under the program "Investissements d'Avenir" ANR-11-IDEX-0003-01. CF, FM, and AD are fellowship recipients from DIM Biothérapies, the French Ministry, and the Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, respectively. The authors thank Dr. K. Liittschwager (4Clinics, Paris, France) for editing the manuscript. Figures were adapted from Servier Medical Art (http://smart.servier.fr/servier-medical-art) under licence Creative Commons Attribution 3.0 France (http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/fr/).

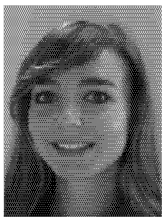
References

[1] Duda DG, Kozin SV, Kirkpatrick ND, Xu L, Fukumura D, Jain RK. CXCL12 (SDF1alpha)-CXCR4/CXCR7 pathway inhibition: an emerging sensitizer for anticancer therapies? Clin Cancer Res 2011;17:2074–80.
[2] Rankin SM. Chemokines and adult bone marrow stem cells. Immunol Lett 2012;145:47–54.
[3] Kryczek I, Lange A, Mottram P, Alvarez X, Cheng P, Hogan M, et al. CXCL12 and vascular endothelial growth factor synergistically induce neoangiogenesis in human ovarian cancers. Cancer Res 2005;65:465–72.
[4] Teicher BA, Fricker SP. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. Clin Cancer Res 2010;16:2927–31.
[5] Balabanian K, Lagane B, Infantino S, Chow KY, Harriague J, Moepps B, et al. The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. J Biol Chem 2005;280:35760–66.
[6] Burns JM, Summers BC, Wang Y, Melikian A, Berahovich R, Miao Z, et al. A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. J Exp Med 2006;203:2201–13.
[7] Bachelerie F, Ben-Baruch A, Burkhardt AM, Combadiere C, Farber JM, Graham GJ, et al. International Union of Pharmacology, LXXXIX. Update on the extended family of chemokine receptors and introducing a new nomenclature for atypical chemokine receptors. Pharmacol Rev 2014;66:1–79.
[8] Sierro F, Biben C, Martinez-Munoz L, Mellado M, Ransohoff RM, Li M, et al. Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7. Proc Natl Acad Sci U S A 2007;104:14759–64.
[9] Libert F, Parmentier M, Lefort A, Dumont JE, Vassart G. Complete nucleotide sequence of a putative G protein coupled receptor: RDC1. Nucl Acids Res 1990;18:1917.
[10] Heesen M, Berman MA, Charest A, Housman D, Gerard C, Dorf ME. Cloning and chromosomal mapping of an orphan chemokine receptor: mouse RDC1. Immunogenetics 1998;47:364–70.
[11] Joost P, Methner A. Phylogenetic analysis of 277 human G-protein-coupled receptors as a tool for the prediction of orphan receptor ligands. Genome Biol 2002;3 [RESEARCH0063].
[12] Graham GJ, Locati M, Mantovani A, Rot A, Thelen M. The biochemistry and biology of the atypical chemokine receptors. Immunol Lett 2012;145:30–8.
[13] Luker KE, Steele JM, Mihalko LA, Ray P, Luker GD. Constitutive and chemokine-dependent internalization and recycling of CXCR7 in breast cancer cells to degrade chemokine ligands. Oncogene 2010;29:4599–610.
[14] Balabanian K, Levoye A, Klemm L, Lagane B, Hermine O, Harriague J, et al. Leukocyte analysis from WHIM syndrome patients reveals a pivotal role for GRK3 in CXCR4 signaling. J Clin Invest 2008;118:1074–84.
[15] Signoret N, Oldridge J, Pelchen-Matthews A, Klasse PJ, Tran T, Brass LF, et al. Phorbol esters and SDF-1 induce rapid endocytosis and down modulation of the chemokine receptor CXCR4. J Cell Biol 1997;139:651–64.
[16] Canals M, Scholten DJ, de Munnik S, Han MK, Smit MJ, Leurs R. Ubiquitination of CXCR7 controls receptor trafficking. PLoS ONE 2012;7:e34192.
[17] Marchese A, Benovic JL. Agonist-promoted ubiquitination of the G protein-coupled receptor CXCR4 mediates lysosomal sorting. J Biol Chem 2001;276:45509–12.
[18] Marchese A, Trejo J. Ubiquitin-dependent regulation of G protein-coupled receptor trafficking and signaling. Cell Signal 2013;25:707–16.
[19] Hoffmann F, Muller W, Schutz D, Penfold ME, Wong YH, Schulz S, et al. Rapid uptake and degradation of CXCL12 depend on CXCR7 carboxyl-terminal serine/threonine residues. J Biol Chem 2012;287:28362–77.
[20] Ray P, Mihalko LA, Coggins NL, Moudgil P, Ehrlich A, Luker KE, et al. Carboxy-terminus of CXCR7 regulates receptor localization and function. Int J Biochem Cell Biol 2012;44:669–78.
[21] Rajagopal S, Kim J, Ahn S, Craig S, Lam CM, Gerard NP, et al. Beta-arrestin- but not G protein-mediated signaling by the decoy receptor CXCR7. Proc Natl Acad Sci U S A 2010;107:628–32.
[22] Kumar R, Tripathi V, Ahmad M, Nath N, Mir RA, Chauhan SS, et al. CXCR7 mediated Gialpha independent activation of ERK and Akt promotes cell survival and chemotaxis in T cells. Cell Immunol 2012;272:230–41.
[23] Boldajipour B, Mahabaleshwar H, Kardash E, Reichman-Fried M, Blaser H, Minina S, et al. Control of chemokine-guided cell migration by ligand sequestration. Cell 2008;132:463–73.
[24] Ray P, Lewin SA, Mihalko LA, Lesher-Perez SC, Takayama S, Luker KE, et al. Secreted CXCL12 (SDF-1) forms dimers under physiological conditions. Biochem J 2012;442:433–42.
[25] Naumann U, Cameroni E, Pruenster M, Mahabaleshwar H, Raz E, Zerwes HG, et al. CXCR7 functions as a scavenger for CXCL12 and CXCL11. PLoS ONE 2010;5:e9175.
[26] Berahovich RD, Zabel BA, Lewen S, Walters MJ, Ebsworth K, Wang Y, et al. Endothelial expression of CXCR7 and the regulation of systemic CXCL12 levels. Immunology 2014;141:111–22.
[27] Haege S, Einer C, Thiele S, Mueller W, Nietzsche S, Lupp A, et al. CXC chemokine receptor 7 (CXCR7) regulates CXCR4 protein expression and capillary tuft development in mouse kidney. PLoS ONE 2012;7:e42814.
[28] Sanchez-Alcaniz JA, Haege S, Mueller W, Pla R, Mackay F, Schulz S, et al. Cxcr7 controls neuronal migration by regulating chemokine responsiveness. Neuron 2011;69:77–90.
[29] Uto-Konomi A, McKibben B, Wirtz J, Sato Y, Takano A, Nanki T, et al. CXCR7 agonists inhibit the function of CXCL12 by down-regulation of CXCR4. Biochem Biophys Res Commun 2013;431:772–6.
[30] Veldkamp CT, Peterson FC, Pelzek AJ, Volkman BF. The monomer-dimer equilibrium of stromal cell-derived factor-1 (CXCL12) is altered by pH, phosphate, sulfate, and heparin. Protein Sci 2005;14:1071–81.
[31] Veldkamp CT, Seibert C, Peterson FC, De la Cruz NB, Haugner 3rd JC, Basnet H, et al. Structural basis of CXCR4 sulfotyrosine recognition by the chemokine SDF-1/CXCL12. Sci Signal 2008;1:ra4.
[32] Thelen M, Thelen S. CXCR7 CXCR4 and CXCL12: an eccentric trio? J Neuroimmunol 2008;198:9–13.
[33] Wu B, Chien EY, Mol CD, Fenalti G, Liu W, Katritch V, et al. Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. Science 2010;330:1066–71.
[34] Percherancier Y, Berchiche YA, Slight I, Volkmer-Engert R, Tamamura H, Fujii N, et al. Bioluminescence resonance energy transfer reveals ligand-induced conformational changes in CXCR4 homo-and heterodimers. J Biol Chem 2005;280:9895–903.
[35] Decaillot FM, Kazmi MA, Lin Y, Ray-Saha S, Sakmar TP, Sachdev P. CXCR7/CXCR4 heterodimer constitutively recruits beta-arrestin to enhance cell migration. J Biol Chem 2011;286:32188–97.
[36] Kramp BK, Sarabi A, Koenen RR, Weber C. Heterophilic chemokine receptor interactions in chemokine signaling and biology. Exp Cell Res 2011;317:655–63.
[37] Levoye A, Balabanian K, Baleux F, Bachelerie F, Lagane B. CXCR7 heterodimerizes with CXCR4 and regulates CXCL12-mediated G protein signaling. Blood 2009;113:6085–93.
[38] Hartmann TN, Grabovsky V, Pasvolsky R, Shulman Z, Buss EC, Spiegel A, et al. A crosstalk between intracellular CXCR7 and CXCR4 involved in rapid CXCL12-triggered integrin activation but not in chemokine-triggered motility of human T lymphocytes and CD34+ cells. J Leuk Biol 2008;84:1130–40.
[39] Hattermann K, Held-Feindt J, Lucius R, Muerkoster SS, Penfold ME, Schall TJ, et al. The chemokine receptor CXCR7 is highly expressed in human glioma cells and mediates antiapoptotic effects. Cancer Res 2010;70:3299–308.
[40] Miao Z, Luker KE, Summers BC, Berahovich R, Bhojani MS, Rehemtulla A, et al. CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumor growth in vivo and is expressed on tumor-associated vasculature. Proc Natl Acad Sci U S A 2007;104:15735–40.
[41] Maishi N, Ohga N, Hida Y, Akiyama K, Kitayama K, Osawa T, et al. CXCR7: a novel tumor endothelial marker in renal cell carcinoma. Pathol Int 2012;62:309–17.
[42] Schutyser E, Su Y, Yu Y, Gouwy M, Zaja-Milatovic S, Van Damme J, et al. Hypoxia enhances CXCR4 expression in human microvascular endothelial cells and human melanoma cells. Eur Cytokine Netw 2007;18:59–70.
[43] Esencay M, Sarfraz Y, Zagzag D. CXCR7 is induced by hypoxia and mediates glioma cell migration towards SDF-1alpha. BMC Cancer 2013;13:347.
[44] Liu H, Xue W, Ge G, Luo X, Li Y, Xiang H, et al. Hypoxic preconditioning advances CXCR4 and CXCR7 expression by activating HIF-1alpha in MSCs. Biochem Biophys Res Commun 2010;401:509–15.
[45] Van Rechem C, Rood BR, Touka M, Pinte S, Jenal M, Guerardel C, et al. Scavenger chemokine (CXC motif) receptor 7 (CXCR7) is a direct target gene of HIC1 (hypermethylated in cancer 1). J Biol Chem 2009;284:20927–35.
[46] Zheng J, Wang J, Sun X, Hao M, Ding T, Xiong D, et al. HIC1 modulates prostate cancer progression by epigenetic modification. Clin Cancer Res 2013;19:1400–10.
[47] Staton AA, Knaut H, Giraldez AJ. miRNA regulation of Sdf1 chemokine signaling provides genetic robustness to germ cell migration. Nat Genet 2011;43:204–11.
[48] Liu L, Zhao X, Zhu X, Zhong Z, Xu R, Wang Z, et al. Decreased expression of miR-430 promotes the development of bladder cancer via the upregulation of CXCR7. Mol Med Rep 2013;8:140–6.
[49] Wang L, Zhang X, Jia LT, Hu SJ, Zhao J, Yang JD, et al. c-Myc-mediated epigenetic silencing of microRNA-101 contributes to dysregulation of multiple pathways in hepatocellular carcinoma. Hepatology 2013;59:1850–63.
[50] Luker KE, Lewin SA, Mihalko LA, Schmidt BT, Winkler JS, Coggins NL, et al. Scavenging of CXCL12 by CXCR7 promotes tumor growth and metastasis of CXCR4-positive breast cancer cells. Oncogene 2012;31:4750–8.
[51] Drury LJ, Ziarek JJ, Gravel S, Veldkamp CT, Takekoshi T, Hwang ST, et al. Monomeric and dimeric CXCL12 inhibit metastasis through distinct CXCR4 interactions and signaling pathways. Proc Natl Acad Sci U S A 2011;108:17655–60.
[52] Heinrich EL, Lee W, Lu J, Lowy AM, Kim J. Chemokine CXCL12 activates dual CXCR4 and CXCR7-mediated signaling pathways in pancreatic cancer cells. J Transl Med 2012;10:68.
[53] Hernandez L, Magalhaes MA, Coniglio SJ, Condeelis JS, Segall JE. Opposing roles of CXCR4 and CXCR7 in breast cancer metastasis. Breast Cancer Res 2011;13:R128.
[54] Liberman J, Sartelet H, Flahaut M, Muhlethaler-Mottet A, Coulon A, Nyalendo C, et al. Involvement of the CXCR7/CXCR4/CXCL12 axis in the malignant progression of human neuroblastoma. PLoS ONE 2012;7:e43665.
[55] Dai X, Tan Y, Cai S, Xiong X, Wang L, Ye Q, et al. The role of CXCR7 on the adhesion, proliferation and angiogenesis of endothelial progenitor cells. J Cell Mol Med 2011;15:1299–309.

[56] Wang J, Shiozawa Y, Wang Y, Jung Y, Pienta KJ, Mehra R, et al. The role of CXCR7/RDC1 as a chemokine receptor for CXCL12/SDF-1 in prostate cancer. J Biol Chem 2008;283:4283–94.
[57] Singh RK, Lokeshwar BL. The IL-8-regulated chemokine receptor CXCR7 stimulates EGFR signaling to promote prostate cancer growth. Cancer Res 2011;71:3268–77.
[58] Zheng K, Li HY, Su XL, Wang XY, Tian T, Li F, et al. Chemokine receptor CXCR7 regulates the invasion, angiogenesis and tumor growth of human hepatocellular carcinoma cells. J Exp Clin Cancer Res 2010;29:31.
[59] Maussang D, Mujic-Delic A, Descamps FJ, Stortelers C, Vanlandschoot P, Stigter-van Walsum M, et al. Llama-derived single variable domains (nanobodies) directed against chemokine receptor CXCR7 reduce head and neck cancer cell growth in vivo. J Biol Chem 2013;288:29562–72.
[60] Goguet-Surmenian E, Richard-Fiardo P, Guillemot E, Benchetrit M, Gomez-Brouchet A, Buzzo P, et al. CXCR7-mediated progression of osteosarcoma in the lungs. Br J Cancer 2013;109:1579–85.
[61] Choi YH, Burdick MD, Strieter BA, Mehrad B, Strieter RM. CXCR4, but not CXCR7, discriminates metastatic behavior in non-small cell lung cancer cells. Mol Cancer Res 2014;12:38–47.
[62] Zabel BA, Wang Y, Lewen S, Berahovich RD, Penfold ME, Zhang P, et al. Elucidation of CXCR7-mediated signaling events and inhibition of CXCR4-mediated tumor cell transendothelial migration by CXCR7 ligands. J Immunol 2009;183:3204–11.
[63] Zabel BA, Lewen S, Berahovich RD, Jaen JC, Schall TJ. The novel chemokine receptor CXCR7 regulates trans-endothelial migration of cancer cells. Mol Cancer 2011;10:73.
[64] Xue TC, Chen RX, Ren ZG, Zou JH, Tang ZY, Ye SL. Transmembrane receptor CXCR7 increases the risk of extrahepatic metastasis of relatively well-differentiated hepatocellular carcinoma through upregulation of osteopontin. Oncol Rep 2013;30:105–10.
[65] Sanchez-Martin L, Sanchez-Mateos P, Cabanas C. CXCR7 impact on CXCL12 biology and disease. Trends Mol Med 2013;19:12–22.
[66] Cook LB, Elemans M, Rowan AG, Asquith B. HTLV-1: persistence and pathogenesis. Virology 2013;435:131–40.
[67] Jin Z, Nagakubo D, Shirakawa AK, Nakayama T, Shigeta A, Hieshima K, et al. CXCR7 is inducible by HTLV-1 Tax and promotes growth and survival of HTLV-1-infected T cells. Int J Cancer 2009;125:2229–35.
[68] Crawford DH. Biology and disease associations of Epstein–Barr virus. Philos Trans R Soc Lond Ser B Biol Sci 2001;356:461–73.
[69] Cohen JI, Wang F, Mannick J, Kieff E. Epstein–Barr virus nuclear protein 2 is a key determinant of lymphocyte transformation. Proc Natl Acad Sci U S A 1989;86:9558–62.
[70] Maier S, Staffler G, Hartmann A, Hock J, Henning K, Grabusic K, et al. Cellular target genes of Epstein–Barr virus nuclear antigen 2. J Virol 2006;80:9761–71.
[71] Spender LC, Lucchesi W, Bodelon G, Bilancio A, Karstegl CE, Asano T, et al. Cell target genes of Epstein–Barr virus transcription factor EBNA-2: induction of the p55alpha regulatory subunit of PI3-kinase and its role in survival of EREB2.5 cells. J Gen Virol 2006;87:2859–67.
[72] Lucchesi W, Brady G, Dittrich-Breiholz O, Kracht M, Russ R, Farrell PJ. Differential gene regulation by Epstein–Barr virus type 1 and type 2 EBNA2. J Virol 2008;82:7456–66.
[73] Rickinson AB, Young LS, Rowe M. Influence of the Epstein–Barr virus nuclear antigen EBNA 2 on the growth phenotype of virus-transformed B cells. J Virol 1987;61:1310–7.
[74] Cancian L, Bosshard R, Lucchesi W, Karstegl CE, Farrell PJ. C-terminal region of EBNA-2 determines the superior transforming ability of type 1 Epstein–Barr virus by enhanced gene regulation of LMP-1 and CXCR7. PLoS Pathog 2011;7:e1002164.
[75] Zhao B, Mar JC, Maruo S, Lee S, Gewurz BE, Johannsen E, et al. Epstein–Barr virus nuclear antigen 3C regulated genes in lymphoblastoid cell lines. Proc Natl Acad Sci U S A 2011;108:337–42.
[76] Ehlin-Henriksson B, Mowafi F, Klein G, Nilsson A. Epstein–Barr virus infection negatively impacts the CXCR4-dependent migration of tonsillar B cells. Immunology 2006;117:379–85.
[77] Li J, Zhang XS, Xie D, Deng HX, Gao YF, Chen QY, et al. Expression of immune-related molecules in primary EBV-positive Chinese nasopharyngeal carcinoma: associated with latent membrane protein 1 (LMP1) expression. Cancer Biol Ther 2007;6:1997–2004.
[78] Hengge UR, Ruzicka T, Tyring SK, Stuschke M, Roggendorf M, Schwartz RA, et al. Update on Kaposi's sarcoma and other HHV8 associated diseases. Part 1: epidemiology, environmental predispositions, clinical manifestations, and therapy. Lancet Infect Dis 2002;2:281–92.
[79] Poole LJ, Yu Y, Kim PS, Zheng QZ, Pevsner J, Hayward GS. Altered patterns of cellular gene expression in dermal microvascular endothelial cells infected with Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. J Virol 2002;76:3395–420.
[80] Moses AV, Jarvis MA, Raggo C, Bell YC, Ruhl R, Luukkonen BG, et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-induced upregulation of the c-kit proto-oncogene, as identified by gene expression profiling, is essential for the transformation of endothelial cells. J Virol 2002;76:8383–99.
[81] Raggo C, Ruhl R, McAllister S, Koon H, Dezube BJ, Fruh K, et al. Novel cellular genes essential for transformation of endothelial cells by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. Cancer Res 2005;65:5084–95.
[82] Pablos JL, Amara A, Bouloc A, Santiago B, Caruz A, Galindo M, et al. Stromal-cell derived factor is expressed by dendritic cells and endothelium in human skin. Am J Pathol 1999;155:1577–86.
[83] Punj V, Matta H, Schamus S, Tamewitz A, Anyang B, Chaudhary PM. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded viral FLICE inhibitory protein (vFLIP) K13 suppresses CXCR4 expression by upregulating miR-146a. Oncogene 2010;29:1835–44.
[84] Yao L, Salvucci O, Cardones AR, Hwang ST, Aoki Y, De La Luz Sierra M, et al. Selective expression of stromal-derived factor-1 in the capillary vascular endothelium plays a role in Kaposi sarcoma pathogenesis. Blood 2003;102:3900–5.
[85] Wang JF, Liu ZY, Anand AR, Zhang X, Brown LF, Dezube BJ, et al. Alpha-chemokine-mediated signal transduction in human Kaposi's sarcoma spindle cells. Biochim Biophys Acta 2004;1691:129–39.
[86] Munger K, Howley PM. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. Virus Res 2002;89:213–28.
[87] Vargas-Parada L. Pathology three questions. Nature 2012;488:S14–5.
[88] Hernandez PA, Gorlin RJ, Lukens JN, Taniuchi S, Bohinjec J, Francois F, et al. Mutations in the chemokine receptor gene CXCR4 are associated with WHIM syndrome, a combined immunodeficiency disease. Nat Genet 2003;34:70–4.
[89] Balabanian K, Lagane B, Pablos JL, Laurent L, Planchenault T, Verola O, et al. WHIM syndromes with different genetic anomalies are accounted for by impaired CXCR4 desensitization to CXCL12. Blood 2005;105:2449–57.
[90] Chow KY, Brotin E, Ben Khalifa Y, Carthagena L, Teissier S, Danckaert A, et al. A pivotal role for CXCL12 signaling in HPV-mediated transformation of keratinocytes: clues to understanding HPV-pathogenesis in WHIM syndrome. Cell Host Microbe 2010;8:523–33.
[91] Amine A, Rivera S, Opolon P, Dekkal M, Biard DS, Bouamar H, et al. Novel anti-metastatic action of cidofovir mediated by inhibition of E6/E7, CXCR4 and Rho/ROCK signaling in HPV tumor cells. PLoS ONE 2009;4:e5018.
[92] Bollag WB, Hill WD. CXCR4 in epidermal keratinocytes: crosstalk within the skin. J Invest Dermatol 2013;133:2505–8.
[93] Zhong C, Wang J, Li B, Xiang H, Ultsch M, Coons M, et al. Development and preclinical characterization of a humanized antibody targeting CXCL12. Clin Cancer Res 2013;19:4433–45.
[94] Hachet-Haas M, Balabanian K, Rohmer F, Pons F, Franchet C, Lecat S, et al. Small neutralizing molecules to inhibit actions of the chemokine CXCL12. J Biol Chem 2008;283:23189–99.
[95] Pusic I, DiPersio JF. Update on clinical experience with AMD3100, an SDF-1/CXCL12-CXCR4 inhibitor, in mobilization of hematopoietic stem and progenitor cells. Curr Opin Hematol 2010;17:319–26.
[96] Wong D, Korz W. Translating an antagonist of chemokine receptor CXCR4: from bench to bedside. Clin Cancer Res 2008;14:7975–80.
[97] Gravel S, Malouf C, Boulais PE, Berchiche YA, Oishi S, Fujii N, et al. The peptidomimetic CXCR4 antagonist TC14012 recruits beta-arrestin to CXCR7: roles of receptor domains. J Biol Chem 2010;285:37939–43.
[98] Kalatskaya I, Berchiche YA, Gravel S, Limberg BJ, Rosenbaum JS, Heveker N. AMD3100 is a CXCR7 ligand with allosteric agonist properties. Mol Pharmacol 2009;75:1240–7.
[99] Yoshikawa Y, Oishi S, Kubo T, Tanahara N, Fujii N, Furuya T. Optimized method of G-protein-coupled receptor homology modeling: its application to the discovery of novel CXCR7 ligands. J Med Chem 2013;56:4236–51.
[100] Hao M, Zheng J, Hou K, Wang J, Chen X, Lu X, et al. Role of chemokine receptor CXCR7 in bladder cancer progression. Biochem Pharmacol 2012;84:204–14.

Christelle Freitas is currently a PhD student in immunology, Paris Sud University, ED 425, Immunology Section of the "Innovative Therapeutics" under the mentorship of Dr Karl Balabanian (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale INSERM 996 Unit). She has been graduated from Cergy-Pontoise University and from Paris-Sud XI University (Master's degree in biology of reproduction in 2012). Her research interest has been first focused on the ACKR3 expression in epithelial ovarian cancer under the mentorship of Dr Véronique Machelon (INSERM 996 Unit). Her PhD research project focuses on the impact of the gain of CXCR4 function on the hematopoietic compartment in the WHIM syndrome.

Aude Desnoyer, Pharm D, got her diploma in Pharmacy in 2014. She is currently a PhD student in immunology after she has obtained a Master's degree in immunology at Paris-Sud University in 2012. After her residency in clinical pharmacy, in Assistance Publique – Hopitaux de Paris, she is pursuing her PhD scholar at Paris-Sud University, ED 425, Immunology Section of the "Innovative Therapeutics" under the mentorship of Dr Karl Balabanian (INSERM 996 Unit). Her research interest is primarily focused on the role of CXCL12 and its receptors in Kaposi's sarcoma progression and on therapeutic perspectives.



Floriane Meuris is currently a PhD student in immunology, Paris Sud University, ED 425, Immunology Section of the "Innovative Therapeutics" under the mentorship of Dr Françoise Bachelerie (INSERM 996 Unit). She was graduated in 2011 from the National Graduate School of Chemistry (Montpellier) and has obtained a master's degree in biology – major: health and drug – the same year. Her PhD research project focuses on the role of the CXCL12/CXCR4-ACKR3 signaling axis on human papillomavirus pathogenesis.

Françoise Bachelerie, Senior Scientist Director of Research at INSERM has over 20 years of experience in the biology and physiopathology of chemokine receptors with a special focus on the interplay with viruses (Human Immunodeficiency Virus and Human Papillomavirus Virus). She is deputy Director of the "Institut Paris Sud d'Innovation Thérapeutique" (IFR141-IPSIT) and the "Cytokines, Chemokines and Immunopathology" laboratory (INSERM 996 Unit) where she heads a research team working on Dendritic cells, Regulatory T cells and Chemokines in viral persistance and immune tolerance. She is member of networks and consortia dealing with G-Protein-Coupled Receptors physiopathology and Research on Medication and Innovative Therapeutics. She is engaged in a consortium of excellence of the University of South-Paris (LabEx LERMIT).

Karl Balabanian is a senior researcher (CR1 INSERM) of the INSERM 996 Unit and has over 10 years of experience in the genetic, molecular and functional studies of chemokines and their receptors in human immune disorders. He received his PhD degree in Immunology from the University of South-Paris. From 2003 to 2007, he performed a Post-Doctorate at the Pasteur Institute of Paris. Currently, he coordinates the Immunology Section of the "Innovative Therapeutics" Doctoral School and heads a research team with translational activities focused on deciphering the role of the CXCL12/CXCR4-ACKR3 signaling trio in autoimmunity, immunodeficiency and B-cell malignancy. He is member of networks and consortia dealing with G-Protein-Coupled Receptors physiopathology and Research on Medication and Innovative Therapeutics. Additionally, he is engaged in a consortium of excellence of the University of South-Paris (LabEx LERMIT) dealing with Research on Medication and Innovative Therapeutics in the context of which his team in collaboration with chemists aims at producing new classes of antagonists for chemokines and their receptors.

Véronique Machelon Pharm PhD, has got a permanent position of Researcher (CR1) at the Biological Institute of sciences Center national de la recherche scientifique CNRS in 1977. She has been graduated as Pharmacist in 1973 (Paris Descartes University) and later on obtained her PhD degree in 1983 (Paris Sud University). She has over 35 years of experience in cellular biology and over 25 years of experience in physiopathology of ovaries. She has joined as a senior scientist the department of immunology of INSERM 996 Unit in Karl Balabanian's team in Clamart (France) in 2000. Her research interests are currently centered on ovarian cancers with a focus on the role of cytokines and chemokines with respect to tumor development and progression. She is currently engaged in the consortium of excellence of Paris Sud University (LabEx LERMIT).

2) Article 4

Annexe 2

DUSP4-mediated accelerated T-cell senescence in idiopathic CD4 lymphopenia

Bignon A, Régent A, Klipfel L, **Desnoyer A**, de la Grange P, Martinez V, Lortholary O, Dalloul A, Mouthon L, Balabanian K.

Blood. 2015 Volume 125 Issue 16:2507-18.
doi: 10.1182/blood-2014-08-598565, PMID: 25733583

From www.bloodjournal.org by guest on June 22, 2015. For personal use only.

Regular Article

IMMUNOBIOLOGY

DUSP4-mediated accelerated T-cell senescence in idiopathic CD4 lymphopenia

Alexandre Bignon,[1,2] Alexis Régent,[3,4] Laurence Klipfel,[1,2] Aude Desnoyer,[1,2] Pierre de la Grange,[5] Valérie Martinez,[1,2,6] Olivier Lortholary,[7,8] Ali Dalloul,[1,2] Luc Mouthon,[3,4] and Karl Balabanian[1,2]

[1]Université Paris-Sud, Laboratoire "Chemokines and Immunopathology," Unité Mixte de Recherche S996, Clamart, France; [2]INSERM, Laboratory of Excellence in Research on Medication and Innovative Therapeutics, Clamart, France; [3]Institut Cochin, INSERM U1016, Centre National de la Recherche Scientifique Unité Mixte de Recherche 8104, Université Paris Descartes, Paris, France; [4]Service de Médecine Interne, Hôpital Cochin, Département Hospitalo-Universitaire Autoimmune and Hormonal Diseases, Assistance Publique–Hôpitaux de Paris, Paris, France; [5]GenoSplice, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, France; [6]Service de Médecine Interne et d'Immunologie Clinique, Assistance Publique–Hôpitaux de Paris, Hôpital Antoine-Béclère, Clamart, France; [7]Université Paris Descartes, Assistance Publique–Hôpitaux de Paris, Centre d'Infectiologie Necker-Pasteur, Institut Hospitalo-Universitaire Imagine, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris, France; and [8]Institut Pasteur, Unité de Mycologie Moléculaire, Centre National de la Recherche Scientifique Unité de Recherche Associée 3012, Paris, France

Key Points

- Transcriptome and functional analyses reveal accelerated T-cell aging in ICL.
- Dampening of TCR signaling in ICL relies on *DUSP4* overexpression.

Idiopathic CD4 lymphopenia (ICL) is a rare heterogeneous immunological syndrome of unclear etiology. ICL predisposes patients to severe opportunistic infections and frequently leads to poor vaccination effectiveness. Chronic immune activation, expansion of memory T cells, and impaired T-cell receptor (TCR) signaling have been reported in ICL, but the mechanistic and causative links remain unclear. We show that late-differentiated T cells in 20 patients with ICL displayed defective TCR responses and aging markers similar to those found in T cells from elderly subjects. Intrinsic T-cell defects were caused by increased expression of dual-specific phosphatase 4 (DUSP4). Normalization of *DUSP4* expression using a specific siRNA improved CD4$^+$ T-cell activity in ICL, as this restored TCR-induced extracellular signal-regulated kinase activation and increased the expression of the costimulatory molecules CD27 and CD40L. Conversely, repeated TCR stimulation led to defective signaling and *DUSP4* overexpression in control CD4$^+$ T cells. This was associated with gradual acquisition of a memory phenotype and was curtailed by *DUSP4* silencing. These findings identify a premature T-cell senescence in ICL that might be caused by chronic T-cell activation and a consequential DUSP4-dependent dampening of TCR signaling. (*Blood*. 2015;125(16):2507-2518)

Introduction

Idiopathic CD4 lymphopenia (ICL) is a rare disorder characterized by an absolute CD4$^+$ T-cell count lower than 300/mm^3 or lower than 20% of the total T cells on more than 1 cell count in the absence of infection with HIV-1/2 or human T-lymphotropic virus 1/2 or other identified causes of lymphopenia.[1,2] ICL is most frequently diagnosed in adults, although pediatric cases have been reported.[2-5] Patients may show opportunistic infections as a result of a profound deficiency in cell-mediated immune responses.[2,6,7] Although the molecular mechanisms underlying this heterogeneous syndrome are still unclear, loss-of-function mutations have been described for genes encoding various regulators of T-cell receptor (TCR) diversity and signaling.[3,4,8-10] In line with the weak adaptive immunity in ICL, antigen-induced lymphoproliferation, cytokine production, and vaccination responses are diminished.[3,11,12]

ICL might result from defective thymic production or output of T cells, exacerbated peripheral consumption, or any combination of these.[4-6,12-18] Cell-intrinsic or cell-extrinsic factors have been identified in ICL that may participate in the perturbation of CD4$^+$ T-cell homeostasis. These include altered responses to homeostatic cytokines, such as interleukin-2 (IL-2), IL-7, and CXC chemokine ligand 12,[12,15,16] and an enhanced susceptibility of ICL-derived T cells to undergo apoptosis.[17,18] Activation and turnover markers are higher in ICL CD4$^+$ T cells, and the expression levels of these markers inversely correlate with blood CD4$^+$ T-cell counts.[6] Abnormal T-cell activation was also associated with high levels of microbial translocation products in ICL plasma.[19] Thus, persistent stimulation by an unidentified pathogen may be one cause of the chronic immune activation and preferential loss of naive T cells in ICL.[11]

Mechanistic studies have pointed to defective TCR signal transduction in ICL. In one case, low lymphocyte-specific protein tyrosine kinase (Lck)/p56 activity accounted for weak CD4$^+$ T-cell proliferation in response to CD3/TCR stimulation.[20] In addition, a dominant-negative

Submitted August 29, 2014; accepted February 19, 2015. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, March 2, 2015; DOI 10.1182/blood-2014-08-598565.

A.R. and L.K. contributed equally to this study.

The online version of this article contains a data supplement.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

© 2015 by The American Society of Hematology

From www.bloodjournal.org by guest on June 22, 2015. For personal use only.

Table 1. Clinical and immunological characteristics of study participants

Characteristics	Healthy (n = 28)	Elderly (n = 6)	SARC (n = 8)	ICL (n = 20)
Age, years	43.5 (24-60)	91.5 (87-99)	47.5 (31-76)	51.5 (24-76)
Sex (male:female)	11:17	1:5	1:7	10:10
$CD4^+$ T-cell count, cells/mm^3	774 (510-1037)	478 (330-687)*	393 (200-723)*	100 (22-278)***
$CD4^+$ cells, %	46 (37-55)	47.5 (34.6-57.2)	34.5 (20-59)	23 (3-62)**
$CD8^+$ T-cell count, cells/mm^3	437 (258-615)	261 (164-375)	372 (175-393)	112 (15-691)*
$CD8^+$ cells, %	27 (18-35)	25 (16-30)	24 (15-25)	20 (9-77)
CD4:CD8 ratio	1.7 (0.8-4)	1.4 (0.8-1.8)	1.3 (0.6-2.4)	1 (0.05-2.5)*
$CD19^+$ B-cell count, cells/mm^3	239 (137-341)	112 (52-278)*	234 (112-378)	71 (6-547)***
$CD19^+$ cells, %	16 (10-21)	14 (7-20)	18 (12-26)	19 (1.5-46)
Immunoglobulins (g/L)				
IgG	10.9 (6.8-15)	ND	12.7 (10.9-16.6)	9.4 (6.2-12.2)
IgA	2.25 (0.75-3.75)	ND	2.62 (2.58-2.99)	1.17 (0.4-3.3)
IgM	1.3 (0.40-2.20)	ND	0.75 (0.66-1.75)	0.65 (0.37-2.73)
Opportunistic infections				
Human papillomavirus	—	—	—	6
Varicella zoster virus reactivation	—	1	—	2
Cryptococcus neoformans	—	—	—	2†
Pneumocystis jiroveci	—	—	—	2
Mycobacterium avium complex	—	—	—	1†
Asymptomatic	—	5	—	8
Dysimmune diseases				
Autoimmune hemolytic anemia	—	—	—	1
Systemic lupus erythematosus	—	—	—	1
Vitiligo	—	—	—	1
Crohn's disease	—	—	—	1
Cytomegalovirus status				
Serology-positive (IgM IgG$^+$)	ND	ND	ND	8
PCR-positive	ND	ND	ND	0

Data are medians (ranges). All *P* values are compared with healthy individuals (as determined using the Mann-Whitney *U* test).
ND, not determined.
*$P < .05$.
**$P < .005$.
***$P < .0005$.
†One patient with *Cryptococcus neoformans* and *Mycobacterium avium* complex coinfection.

missense mutation has been identified in 1 patient that targets the signaling adaptor protein Unc119 required for Lck transport and activation, and thus for TCR-triggered responses.[8] X-linked mutations in the magnesium transporter gene 1 (*MAGT1*) were also described in 2 related patients, suggesting a role for Mg^{2+} as an intracellular second messenger that couples TCR activation to intracellular effectors.[3] These findings raise the possibility that persistent T-cell activation in ICL leads to dampened TCR-mediated signaling and proliferation.

To gain further insight into the functional pathways implicated in ICL pathophysiology, we compared the gene expression profiles of $CD4^+$ T cells sorted from the blood of patients with ICL and control groups of age-matched healthy subjects and patients with $CD4^+$ T-cell lymphopenia secondary to sarcoidosis (SARC).[21] These arrays enabled us to identify an ICL-related genetic signature with predominant involvement of 2 gene groups: one related to TCR response and the other strikingly associated with T-cell aging. Among the first group, expression of the dual-specific phosphatase 4 (DUSP4), which negatively regulates mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation, was increased, similar in this respect to $CD4^+$ T cells from elderly subjects. Functional studies further linked this overexpression to accelerated T-cell senescence in ICL.

Methods

Subjects

Twenty adult patients who met the definition of ICL established by the Centers for Disease Control and Prevention[1] were recruited at the Cochin Hospital and Centre d'Infectiologie Necker-Pasteur in Paris, France. Descriptions of the healthy, SARC, elderly, and ICL groups are provided in Table 1, supplemental Table 1, and the supplemental Methods, available on the *Blood* Web site. The study was approved by the Comité de Protection des Personnes Île-De-France-I (number 2012-A00172-41).

Sample processing

Whole-blood phenotyping of T-cell subsets was performed as described.[22] Isolation, cryopreservation, thawing, and staining of $CD4^+$ T cells and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were performed as described,[23,24] using monoclonal antibodies detailed in the supplemental Methods. Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE)-loaded PBMCs or $CD4^+$ T cells were either left untreated or stimulated once, twice, or 3 times on anti-CD3/anti-CD28 antibody (Ab)-coated plates for 5 days. Data were collected on a Fortessa flow cytometer.

Microarray analysis

Total RNA was isolated from $CD4^+$ T-cell pellets obtained from healthy, SARC, and ICL subjects, using the miRNAeasy mini kit (Qiagen). Microarray analysis was performed using Affymetrix Human Exon 1.0 ST, according to the manufacturer's recommendations. Data set analysis and visualization were done using EASANA, which is based on GenoSplice FAST DB annotations.[25,26] Array data are available at Gene Expression Omnibus (accession number GSE56998). For details, see supplemental Methods.

Methods for polymerase chain reaction (PCR), *DUSP4* silencing, immunoblot, enzyme-linked immunosorbent assay, telomerase activity, telomere length, and chemotaxis assays, as well as statistical analyses, are described in supplemental Methods.

From www.bloodjournal.org by guest on June 22, 2015. For personal use only.

Table 2. Immunophenotyping of CD4$^+$ T-cell populations

	Healthy (n = 28)	Elderly (n = 6)	SARC (n = 8)	ICL (n = 20)
% CD4$^+$ in T CD3$^+$	61.2 (44.1-71.5)	52.8 (29.9-77.8)*	52.3 (28.3-65.2)*	38.7 (3.52-76.1)**†
In T CD4$^+$:				
% CCR7$^+$ CD45RA$^+$ (NV)	54.9 (18.9-64.3)	25.9 (11-37.7)***	41.2 (25.2-56.3)*	27.6 (11.2-52.4)***
% CCR7$^+$ CD45RA (CM)	28.2 (12.3-41.4)	19.7 (9.5-49.7)	10.2 (5.2-29.1)**	18.2 (5.1-41.3)
% CCR7 CD45RA (EM)	15.6 (5.2-35.5)	23.3 (14.6-37.5)*	20.4 (15.3-47.3)*	30.4 (10.1-44.9)**
% CCR7 CD45RA$^+$ (TEMRA)	10.1 (5-22.3)	31 (17.2-42.5)*	19.6 (17.3-30.2)*	28.5 (12.5-40.8)**
Correlation factor (*r* Spearman's and *P* value)				
Percentage naive and CD4$^+$ T-cell count	ns	0.90 and 0.04	ns	0.44 and 0.049
Percentage activated/memory and CD4$^+$ T-cell count	ns	−0.90 and 0.04	ns	−0.54 and 0.014
CXCR4 in T CD4$^+$ (MFI)				
Total	586 (189-805)	572 (190-1231)	500 (248-610)	199 (47-639)***†
NV	912 (610-1010)	927 (712-1425)	897 (745-958)	287 (112-314)***†
CM	294 (112-357)	274 (97-412)	257 (100-387)	124 (58-220)*†
EM	151 (92-245)	167 (102-258)	102 (56-257)	64 (42-112)**†
TEMRA	382 (212-478)	427 (247-528)	450 (312-524)	77 (55-97)***†
CXCR4 in T CD4$^+$ (%)				
Total	61.5 (38.4-75.7)	67 (37.2-89.3)	60.4 (42.1-76.2)	39.5 (12.4-65.7)**†
NV	80.2 (64.1-94-1)	84.3 (68.2-97.4)	77.5 (55.2-84.3)	39.1 (12.6-48.4)***†
CM	53.2 (44.7-67.7)	56.1 (45.3-71.3)	49.7 (32.1-55.4)	32.4 (22.8-48.6)*†
EM	40.7 (35.1-52.1)	39.3 (42.1-64.8)	42.4 (22.4-58.4)	24.9 (11.3-28.7)**†
TEMRA	59.5 (32.4-64.4)	66.2 (42.1-77.3)	51.8 (33.7-64.7)	26.4 (8.3-32.7)**†
Correlation factor (*r* Spearman's and *P* value)				
CXCR4 MFI and CD4$^+$ T-cell count	ns	ns	ns	0.45 and 0.039
CXCR4 % and CD4$^+$ T-cell count	ns	ns	ns	0.46 and 0.035

Data are medians (ranges). Using the protein tyrosine phosphatase isoform CD45RA and the chemokine receptor CCR7, CD4$^+$ T cells were subdivided into naive (NV), central memory (CM), effector memory (EM), and terminally differentiated effector memory (TEMRA) subpopulations. All *P* values are compared with healthy individuals.

ns, not significant.

*$P < .05$.

**$P < .005$.

***$P < .0005$.

†Significantly different compared with elderly subjects (as determined using the Mann-Whitney *U* test).

Results

Expansion of circulating terminally differentiated effector memory T cells in ICL

We analyzed 20 patients with ICL (Table 1). CD4$^+$ T-cell counts were significantly lower in patients with ICL than in age-matched healthy subjects, and to a lesser extent, these counts were lower than in untreated and uninfected patients with lymphopenia secondary to SARC (supplemental Table 1). CD8$^+$ T-cell counts were lower in patients with ICL than in healthy individuals, although at a lower level of significance. B-cell counts were also significantly lower in patients with ICL, although this did not correspond to lower immunoglobulin (Ig) levels in patient sera. Our cohort was clinically heterogeneous, as 40% of the patients were asymptomatic and 60% presented with opportunistic infections typically observed in CD4$^+$ T-cell deficiencies such as AIDS.[27] Four patients with ICL suffered from dysimmune diseases.

Whole-blood immunophenotyping indicated that circulating CD4$^+$ and CD8$^+$ T-cell lymphopenia in ICL predominantly affected naive cells (Table 2; supplemental Tables 2 and 3). Analyses of the memory T-cell compartment defined by CD45RA and CCR7 expression levels showed that the terminally differentiated effector memory (TEMRA; CD45RA$^+$ CCR7$^-$) subpopulation was expanded in patients with ICL. Contraction of the naive subset and inflation of the TEMRA compartment both correlated with the degree of T-cell lymphopenia (supplemental Figure 1 and Table 3). Impaired T-cell expression of CXCR4, which binds the chemokine CXC chemokine ligand 12, was reported for 6 patients with ICL.[12] We assessed whether CXCR4 dysfunction extended to our larger cohort (Table 2 and supplemental Figure 2). Compared with healthy and SARC T cells, we detected reduced levels of CXCR4 expression and chemotactic function in naive and activated-memory T cells from 17 of 20 patients with ICL. Low levels of CXCR4 expression correlated with the degree of T-cell lymphopenia. Therefore, patients with ICL and SARC differ in peripheral T-cell subset distribution and CXCR4 status.

Gene expression signatures of ICL CD4$^+$ T cells

To gain some mechanistic insight into the functional pathways involved in ICL pathophysiology, we used Affymetrix Exon Arrays to compare the CD4$^+$ T-cell gene expression profiles of representative patients with ICL (n = 9) according to age, sex, and opportunistic infection status with those obtained from subjects in the healthy (n = 8) and SARC (n = 8) control groups. Differential gene expression analyses were performed for patients with ICL vs healthy subjects (Figure 1A; supplemental Table 4) and for patients with ICL vs patients with SARC (supplemental Table 5). Comparisons between healthy individuals and patients with SARC revealed only a few differentially regulated genes in the CD4$^+$ T cells from patients with SARC (supplemental Table 6). In contrast, we found a gene expression signature for the ICL CD4$^+$ T cells compared with the healthy and SARC CD4$^+$ T cells. We identified 291 upregulated and 465 downregulated genes in ICL vs healthy T cells with fold-changes of 1.5 or higher and uncorrected *P* values ≤ 0.05 (Figure 1B; supplemental Table 4).

To identify the canonical pathways differentially modulated in ICL, the ICL signature transcripts were subjected to Gene Ontology and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes pathway analyses. The T-cell genes differentially expressed in ICL were enriched in functional groups associated with telomere shortening, defective T-cell

From www.bloodjournal.org by guest on June 22, 2015. For personal use only.

Table 3. Absence of association between the rate of infections and the senescent state of T cells in patients with ICL

Characteristics	Asymptomatic (n = 8)	Opportunistic infections (n = 12)	*P* value	CMV-negative (n = 12)	CMV-positive (n = 8)	*P* value
$CD4^+$ T-cell count, cells/mm^3	162 (38-278)	40.5 (22-219)	.05	100 (25-222)	187 (22-278)	.5
$CD4^+$ T cells, %	35.5 (3-62)	19 (5-29)	.04	27 (3-62)	23 (5-40)	.36
CD27 CD28 in $CD4^+$ T cells, %	23.5 (3.3-30.7)	27.5 (18.9-59.1)	.06	25.8 (3.3-56.4)	23.2 (10.7-59.1)	.89
$KLRG1^+CD57^+$ in $CD4^+$ T cells, %	7.2 (4.2-13.2)	13 (4.5-46)	.09	11.3 (4.2-33.1)	13.75 (5.5-46)	.32
$CD8^+$ T-cell count, cells/mm^3	104 (46-691)	102.5 (15-392)	.67	55 (15-691)	132 (25-325)	.97
$CD8^+$ T cells, %	18 (13-57)	17.5 (9-77)	.65	15 (10-57)	20 (9-77)	.3
CD27 CD28 in $CD8^+$ T cells, %	26.3 (6.37-49.6)	32.3 (19.8-56.4)	.20	32.1 (19.8-55.2)	32.30 (6.37-56.4)	.57
$KLRG1^+CD57^+$ in $CD8^+$ T cells, %	28 (4.4-35.6)	22.9 (11.5-48.3)	.80	23.2 (4.4-48.3)	32.25 (11.5-43.1)	.58

Data are medians (ranges). Patients were distributed according to the opportunistic infection or serological (negative, IgM IgG ; or positive: IgM IgG$^+$) CMV status. *P* values were determined using the Mann-Whitney *U* test.

signaling, altered immune responses, impaired DNA repair, and p53 signaling (Figure 1C), which are related to cellular senescence. Subsequently, the ICL signature was compared with a list of genes known to change expression levels with increasing age in T cells.[28] Some of the most highly upregulated genes in ICL $CD4^+$ T cells included the DUSP family members *DUSP4*, *DUSP5*, and *DUSP6*, which are MAPK phosphatases that negatively regulate TCR signaling and the immune response.[29-31] We also found that the cell cycle inhibitors *CDKN1A*, *GADD45A*, and *FAS*, all of which are upregulated with increasing age in T cells,[28] were also upregulated in ICL. A striking observation was the marked downregulation in ICL $CD4^+$ T cells of *TERC*, *POT1*, and *DNMT3A*, which are involved in the senescence process. We confirmed the microarray data for selected transcripts by real-time PCR (Figure 1D). These results highlight an ICL-related transcriptional signature suggestive of a diminished TCR response and enhanced aging.

Decreased sensitivity to TCR stimulation in ICL T cells

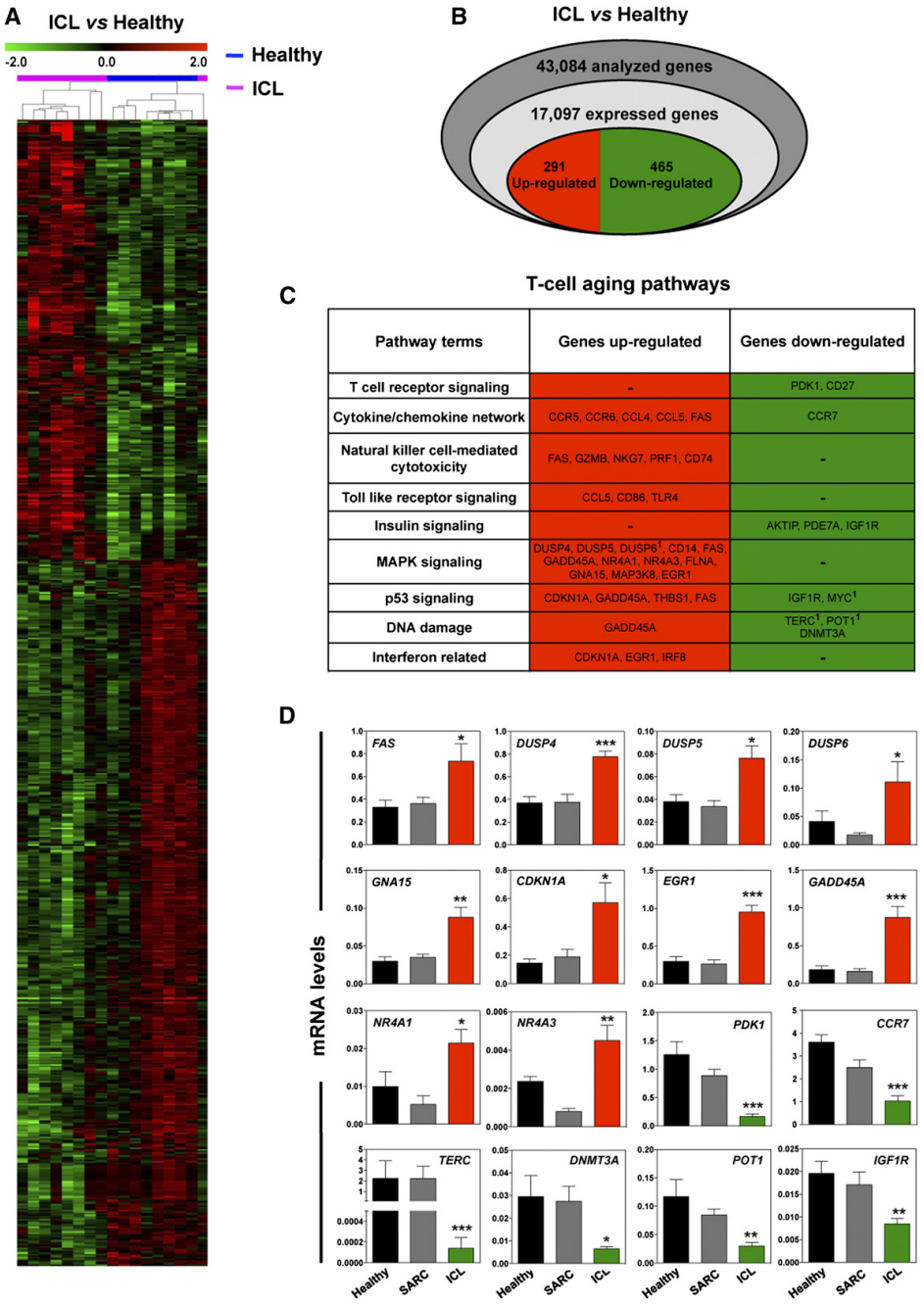
According to our transcriptomic analyses, we investigated the strength of the TCR signaling in ICL $CD4^+$ T cells. These analyses were extended to include T cells from 6 nonagenarian subjects that, similar to ICL T cells, displayed an inflation of the TEMRA phenotype but exhibited normal to high levels of membrane CXCR4 expression and function (Tables 1 and 2; supplemental Tables 2 and 3).[32-34] First, we assessed TCR responsiveness by stimulating CFSE-loaded PBMCs from healthy, elderly, SARC, and ICL subjects on anti-CD3/anti-CD28 Ab-coated plates for 5 days (Figure 2A-B). As expected,[31,35] $CD4^+$ T cells from elderly and SARC subjects exhibited impaired proliferation after TCR engagement. TCR-mediated proliferation was also significantly lower in ICL $CD4^+$ T cells than in healthy cells. Responsiveness to TCR stimulation was similarly affected in ICL $CD8^+$ T cells (supplemental Figure 3A-B). To probe early signaling events after TCR cross-linking, we assessed the phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase 1 (ERK-1) and ERK-2 MAPKs by PhosphoFlow. TCR-induced ERK activation was markedly lower in $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells from elderly, SARC, and ICL individuals than in healthy T cells (Figure 2C-D; supplemental Figure 3C-D). These findings indicate that the TCR response is diminished in ICL T cells. This low level of TCR activation is comparable to that found in elderly subjects, whose T cells are known to be senescent, and in patients with SARC, whose T cells are known to be anergic.[31,35]

Accelerated T-cell senescence in ICL

Reduced TCR signaling intensity and impaired T-cell expansion in response to TCR stimulation are features of T-cell aging or anergy.[36] We thus performed phenotyping analyses for 4 key markers of T-cell senescence: the costimulatory molecules CD27 and CD28 and the natural killer-cell markers CD57 and KLRG-1. As reported,[34] $CD4^+$ T cells from elderly subjects exhibited lower CD27 and CD28 expression levels and higher CD57 and KLRG-1 expressions than those of healthy subjects (Figure 3A-B). This was associated with higher expression of the cytotoxic molecule granzyme B. Although expression levels of these markers were scattered over a large range among patients with ICL, the percentages of $CD27^-$, $CD28^-$, $CD57^+$, KLRG-1^+, and granzyme B^+ $CD4^+$ T cells were significantly higher in this group than in healthy donors. Strikingly, the larger double populations of $KLRG1^+CD57^+$ and $CD27^-CD28^-$ T cells (with an effector memory or TEMRA phenotype) in elderly subjects compared with those in healthy individuals were even more accentuated in patients with ICL. These cells are considered terminally differentiated effector cells and may arise from replicative senescence triggered by repeated antigenic stimulation.[34,36] Consistent with chronic immune activation in ICL was the induction of the activation marker HLA-DR in $CD4^+$ T cells (Figure 3B). We found similar expression patterns for these markers in the $CD8^+$ T-cell compartment of these subjects (supplemental Figure 4). Combined with the CD45RA marker, the CD31 status is used to distinguish thymus-derived naive T cells ($CD45RA^+CD31^+$) from peripherally expanded naive T cells with homeostatic proliferative history ($CD45RA^+CD31^-$).[37] We noticed no change in the frequency of $CD45RA^+CD31^+CD4^+$ T cells in patients with ICL, whereas this population was decreased in the elderly group (supplemental Figure 5A-B). Interestingly, the proportion of $CD45RA^+CD31^-CD4^+$ T cells was markedly decreased in the ICL group.

To characterize the senescent profile of ICL cells, we analyzed telomerase activity and telomere length, which are modulated in part by CD27 or CD28 signaling and are major markers of cellular aging, including that of lymphocytes.[38-40] Telomeres consist of hexanucleotide repeats at the ends of linear chromosomes, together with several associated proteins, some of which, such as POT1, are downregulated in ICL $CD4^+$ T cells (Figure 1). Telomerase is a ribonucleoprotein DNA polymerase consisting of 2 components: TERT, a catalytic reverse transcriptase, and TERC, an RNA template that encodes the telomeric DNA repeats. We found both of these to be downregulated in

From www.bloodjournal.org by guest on June 22, 2015. For personal use only.



Pathway terms	Genes up-regulated	Genes down-regulated
T cell receptor signaling	-	PDK1, CD27
Cytokine/chemokine network	CCR5, CCR6, CCL4, CCL5, FAS	CCR7
Natural killer cell-mediated cytotoxicity	FAS, GZMB, NKG7, PRF1, CD74	-
Toll like receptor signaling	CCL5, CD86, TLR4	-
Insulin signaling	-	AKTIP, PDE7A, IGF1R
MAPK signaling	DUSP4, DUSP5, DUSP6[1], CD14, FAS, GADD45A, NR4A1, NR4A3, FLNA, GNA15, MAP3K8, EGR1	-
p53 signaling	CDKN1A, GADD45A, THBS1, FAS	IGF1R, MYC[1]
DNA damage	GADD45A	TERC[1], POT1[1] DNMT3A
Interferon related	CDKN1A, EGR1, IRF8	-

Figure 1. Aging gene-expression profiles in CD4$^+$ T cells from patients with ICL. (A) Regulated genes across the samples were hierarchically clustered according to their mean-normalized intensity across all samples. Blue and pink samples correspond to CD4$^+$ T cells from healthy subjects (n = 8) and patients with ICL (n = 9), respectively. (B) Venn diagram of analyzed, expressed, and regulated genes in CD4$^+$ T cells for patients with ICL vs healthy subjects. Upregulated and downregulated genes are indicated by red and green colors, respectively. (C) Results extracted from the Gene Ontology analysis, KEGG pathway, and list of genes regulated in healthy T cells during aging[28] were combined to delineate a specific T-cell aging pathway in ICL. [1]Genes that are significantly regulated in another hierarchical clustering. (D) Ten representative genes of the upregulated group and 6 of the downregulated group were monitored by quantitative PCR in healthy (n = 12), SARC (n = 8), and ICL (n = 12) CD4$^+$ T cells. Each individual sample was run in triplicate. Results are expressed as mRNA levels after normalization to *GAPDH* mRNA levels. *$P < .05$, **$P < .005$, and ***$P < .0005$ compared with healthy CD4$^+$ T cells (as determined using the Mann-Whitney *U* test).

From www.bloodjournal.org by guest on June 22, 2015. For personal use only.

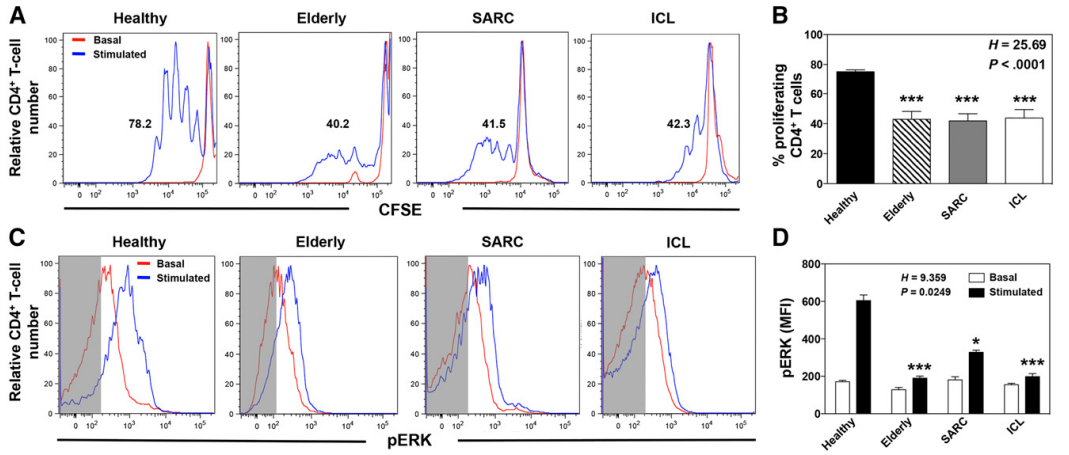


Figure 2. Low responsiveness of ICL CD4$^+$ T cells to TCR stimulation. (A and B) PBMCs from healthy (n = 28), elderly (n = 6), SARC (n = 8), and ICL (n = 20) individuals were CFSE-labeled and stimulated on anti-CD3/anti-CD28 Ab-coated plates or left untreated (basal) for 5 days. Fluorescence intensity loss resulting from division cycles was determined by flow cytometry. Representative plots of the mean fluorescence intensity (MFI) of CFSE in CD4$^+$-gated T cells are shown (A). Results (mean + standard deviation [SD] of 10 independent experiments) are expressed as percentages of proliferating CFSE^{low} (>1 cell division) CD4$^+$ T cells (B). (C and D) PBMCs were stimulated for 5 min by CD3 cross-linking or left untreated and immediately analyzed by PhosphoFlow for intracellular phospho-ERK-1/2 (pERK) content. Representative plots of the MFI of pERK in CD4$^+$-gated T cells are shown. Background fluorescence (shaded area) was assessed using an isotype control Ab (C). The bar graphs summarize the results (expressed as mean + SD) from all analyzed subjects (D). Kruskal-Wallis *H* test and associated *P* values are indicated. *$P < 0.05$ and ***$P < 0.0005$ compared with healthy CD4$^+$ T cells (as determined using the Mann-Whitney *U* test).

ICL (Figure 1). The level of telomerase activity was lower in ICL and elderly PBMCs than in healthy or SARC PBMCs (Figure 3C), and this was associated with shortened telomere length (Figure 3D). To distinguish these observations from exhaustion, we analyzed in ICL T cells the expression levels of the inhibitory receptors PD-1 and CTLA-4.[41] We observed no increase in any of those markers on CD4$^+$ T cells from patients with ICL compared with those markers on healthy cells (supplemental Figure 5A-B). This was associated with no change in the expression of *PRDM1* that encodes B lymphocyte-induced maturation protein-1, a transcriptional repressor highly expressed in exhausted T cells and responsible for the increased expression of coinhibitory receptors (supplemental Figure 5C).[42,43] In addition, ICL T cells were capable of producing significant amounts of interferon-γ after TCR stimulation (supplemental Figure 5D). Combined with the fact that ICL T cells displayed increased expression of senescence-related genes such as *CDKN1A* and *GADD45A* (Figure 1), these results suggest that circulating memory T cells from patients with ICL exhibit an untimely senescent, rather than exhausted, profile similar to that of T cells from healthy elderly individuals.

No effect of opportunistic or chronic infections on T-cell senescence in ICL

There was no significant correlation between the age or T-cell count of patients with ICL and the expression levels of senescent markers (supplemental Table 7). We sought to determine whether T-cell changes in ICL could result from opportunistic or chronic infections. When asymptomatic patients (n = 8) were compared with those who had experienced opportunistic infections (n = 12), no significant difference was obtained for the senescence markers (Table 3). Similarly, the cytomegalovirus (CMV) serological status did not affect the expression levels of senescent markers (Tables 1 and 3). In particular, CD4$^+$ T cells from the youngest patient (24 years old) harbored one of the highest levels of senescence markers (eg, 23.2% CD57$^+$KLRG1$^+$CD4$^+$ T cells and 32.4% CD27$^-$CD28$^-$CD4$^+$ T cells). This patient was CMV IgM- and IgG-negative and had no history of opportunistic infection. In contrast, the oldest patient (76 years old), who belongs to the group that displayed less marked T-cell senescence (eg, 6.2% CD57$^+$ KLRG1$^+$CD4$^+$ T cells and 22.5% CD27$^-$CD28$^-$CD4$^+$ T cells), was CMV IgG-positive and presented clinical signs of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. These findings suggest that accelerated aging in ICL is likely not related to the presence of subsequent infections.

Repeated TCR stimulation leads to *DUSP4* overexpression

One feedback mechanism that regulates the nuclear activities of the MAPK pathway and dampens TCR signaling involves the DUSP family of phosphatases.[44] Increased expression of DUSP6 and DUSP4 with age has been reported in naive and memory CD4$^+$ T cells, respectively.[29,31] To elucidate the mechanism underlying the decrease in TCR-induced ERK activation in expanded-memory T cells from patients with ICL, we investigated the DUSP4 status. As determined by real-time PCR, CD4$^+$ T cells from elderly and patients with ICL exhibited higher *DUSP4* mRNA levels than those of healthy individuals and patients with SARC (Figure 4A). This was also detected for *DUSP6* in accordance with transcriptomic analyses (Figure 1D). To investigate the putative chronic stimulation that has been suggested to occur in ICL,[19] we determined DUSP4 behavior in response to 3 repeated rounds of stimulation with anti-CD3/anti-CD28 Abs that lead to successive induction of TCR-mediated responses. Ultimately, chronically activated T cells reach a senescent profile and do not respond to further stimulation.[45] In healthy CD4$^+$ T cells, repeated TCR engagement led to impaired induction of the proliferative response and to lower ERK phosphorylation (Figure 4B-C). This was associated with a gradual increase in *DUSP4*, but not *DUSP6*, expression (Figure 4D). Two rounds of TCR stimulation were sufficient to give rise to *DUSP4* mRNA levels similar to those detected in nonmanipulated elderly and ICL cells (Figure 4A). *DUSP4*-overexpressing T cells displayed increased expression of HLA-DR in contrast to the strong decline in surface expression of CD45RA,

From www.bloodjournal.org by guest on June 22, 2015. For personal use only.

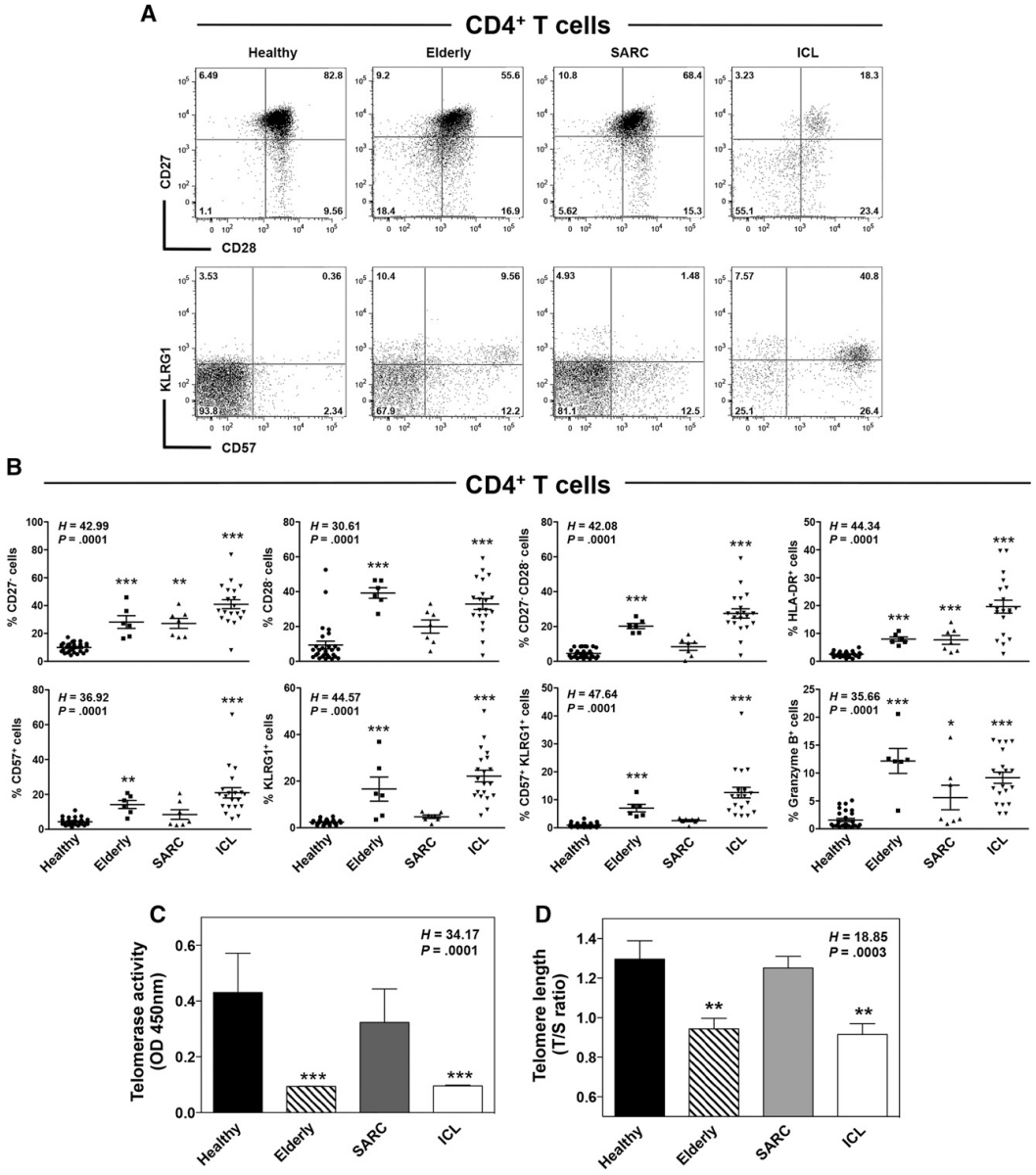


Figure 3. CD4$^+$ T cells exhibit a senescent profile in ICL. (A and B) Flow-cytometric analyses of CD27, CD28, CD57, and KLRG1 expression in CD3$^+$CD4$^+$-gated PBMCs from healthy, elderly, SARC, and ICL subjects. Quadrants were set on controls stained with the corresponding isotype control Ab. Representative dot plots showing coexpression of CD27 and CD28 or CD57 and KLRG1 are shown (A). Comparison of the frequencies of CD27$^-$, CD28$^-$, HLADR$^+$, CD57$^+$, KLRG1$^+$, and granzyme B-expressing CD4$^+$ T cells in healthy (n = 28), elderly (n = 6), SARC (n = 8), and ICL (n = 20) individuals. Lines indicate the mean ± SD values, and each symbol represents the value from an individual (B). (C and D) Telomerase activity (C) and telomere length (D) were measured in PBMCs from the aforementioned groups by Telomere Repeat Amplification Protocol, followed by enzyme-linked immunosorbent assay detection and quantitative PCR, respectively. Results (mean ± SD) are from 3 independent experiments and show the optical density values (C) or are expressed as the ratio of telomere repeat copy number (T) to *albumin* copy number (a single-copy gene, S) within the same DNA sample in each group (D). Kruskal-Wallis *H* test values and associated *P* values are indicated. $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.005$, and $^{***}P < 0.0005$ compared with healthy leukocytes (as determined using the Mann-Whitney *U* test).

CXCR4, and the costimulatory molecules CD27 and CD40L (Figure 4E-F). This expression pattern is consistent with a terminally differentiated phenotype.[29,34] These findings suggest that memory-activated CD4$^+$ T cells respond poorly to successive TCR stimuli and that the consequent increase in *DUSP4* expression constitutes negative regulatory feedback.

From www.bloodjournal.org by guest on June 22, 2015. For personal use only.

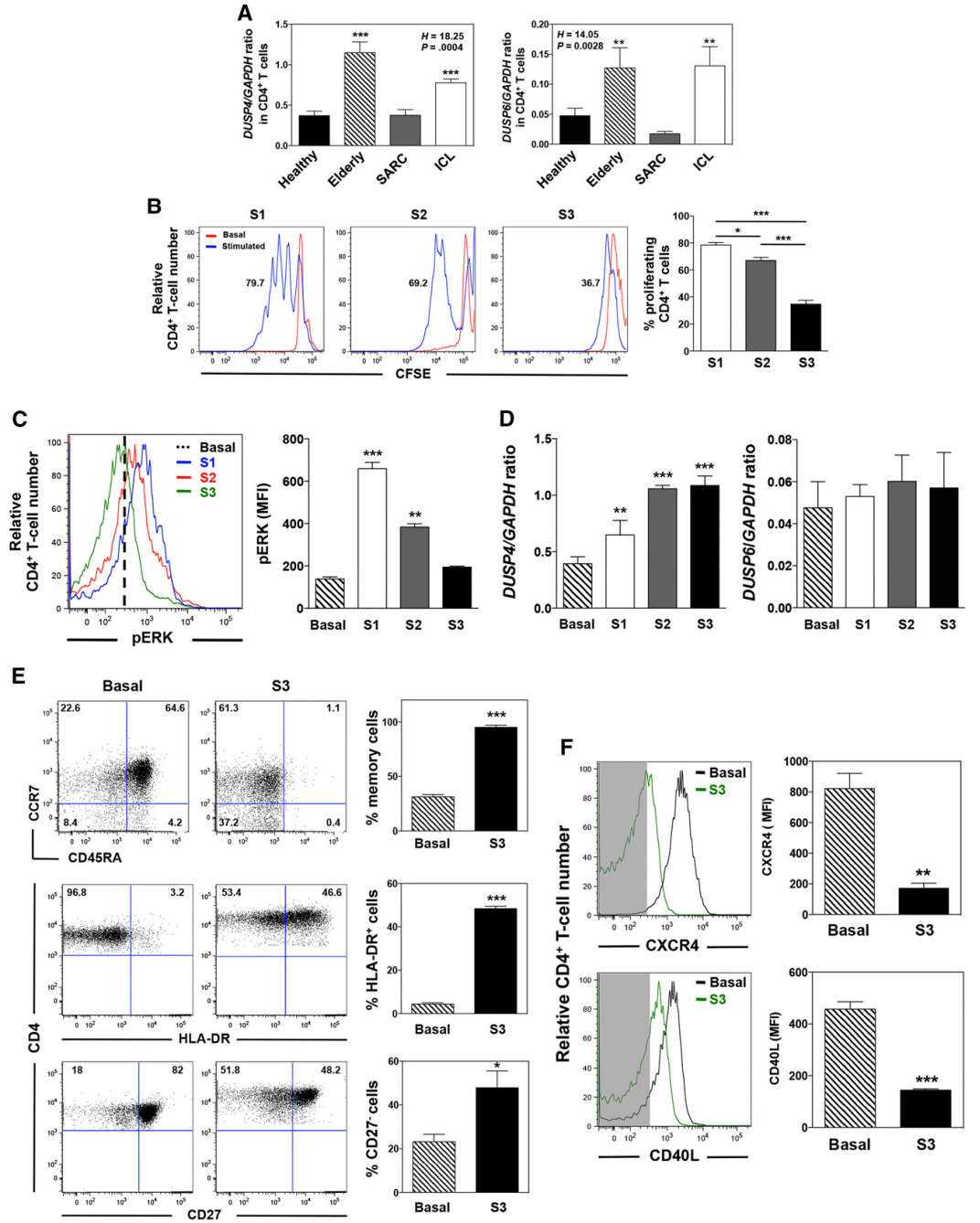


Figure 4. Repeated TCR stimulation leads to defective signaling and *DUSP4* overexpression in healthy CD4$^+$ T cells. (A) Steady-state levels of *DUSP4* and *DUSP6* transcripts in sorted CD4$^+$ T cells from healthy (n = 28), elderly (n = 6), SARC (n = 8), and ICL (n = 20) subjects were assessed by quantitative PCR. Each individual sample was run in triplicate. Results are expressed as *DUSP4* or *DUSP6*/*GAPDH* ratio. (B) CFSE-loaded CD4$^+$ T cells from 9 independent healthy donors were either left untreated (basal) or successively stimulated once, twice, or 3 times (S1-S3) on anti-CD3/anti-CD28 Ab-coated plates for 5 days. Each round of stimulation was separated by a 2-day culture in complete RPMI medium without any stimulation. Representative plots of the MFI of CFSE in CD4$^+$ T cells (left). Results (mean + SD of 3 independent experiments) expressed as fractions of proliferating CFSE^{low} CD4$^+$ T cells (right). Cells were gated on forward and side scatter to eliminate debris and on forward scatter-width/area and side scatter-width/area to gate only single and viable cells. Samples contained between 46.5% and 87.3% viable cells. (C) pERK content was determined in CD4$^+$

From www.bloodjournal.org by guest on June 22, 2015. For personal use only.

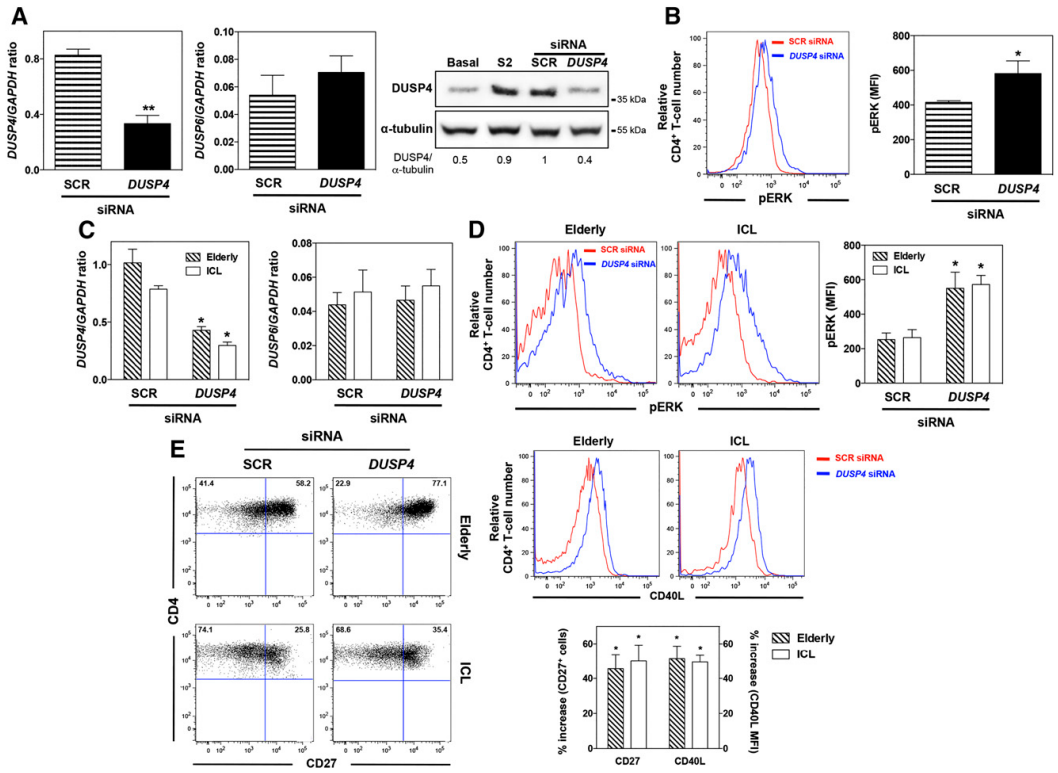


Figure 5. *DUSP4* inhibition ameliorates TCR signaling in senescent CD4$^+$ T cells. (A and B) After 2 rounds of stimulation with anti-CD3/anti-CD28 Abs, activated CD4$^+$ T cells from 3 independent healthy individuals were nucleoporated with 1.5 μg SCR or *DUSP4* siRNAs. Twelve hours after transfection, T cells were stimulated on plates coated with anti-CD3/anti-CD28 Abs for 2 days. DUSP4 and DUSP6 transcript or protein levels were then evaluated by quantitative PCR (left and middle) or immunoblot (right). The ratios of DUSP4 over α-tubulin proteins are indicated below the gels. pERK content was determined by PhosphoFlow in siRNA-transfected T cells restimulated by CD3 cross-linking (B). Representative plots of the MFI of pERK in transfected CD4$^+$ T cells are shown (left). Results show the mean pERK content in transfected CD4$^+$ T cells + SD (right). (C-E) CD4$^+$ T cells from 3 independent elderly or ICL subjects were nucleoporated with 1.5 μg SCR or *DUSP4* siRNAs and then stimulated for 2 days, as described earlier. siRNA-transfected cells were recovered and tested for *DUSP4* and *DUSP6* expression (C) and for their pERK content after CD3 cross-linking (D). On day 3 after stimulation, the frequencies of CD27-expressing cells CD4$^+$ T cells and levels of CD40L expression were determined by flow cytometry and shown as the percentage increase after *DUSP4* silencing (E). Results represent the mean + SD or are representative of 3 independent experiments. $^*P < 0.05$ and $^{**}P < 0.005$ compared with SCR siRNA-transfected CD4$^+$ T cells (as determined using the Mann-Whitney *U* test).

DUSP4 silencing improves T-cell activity in ICL

To determine whether DUSP4 negatively regulates TCR signaling, the activation-induced increase in the level of *DUSP4* mRNAs was silenced in healthy CD4$^+$ T cells after 2 rounds of stimulation. Quantitative PCR and immunoblot analyses revealed that *DUSP4* knockdown reduced expression of DUSP4 by more than 60% compared with the scrambled control (SCR) siRNA (Figure 5A). This was apparently specific, as *DUSP4* siRNA did not affect *DUSP6* expression and permitted DUSP4 expression to return to the basal level. Reduction of *DUSP4* mRNA levels improved TCR-induced ERK phosphorylation in activated CD4$^+$ T cells compared with that in cells transfected with a SCR siRNA (Figure 5B). We next reasoned that *DUSP4* silencing could at least partially ameliorate CD4$^+$ T-cell activation in patients with ICL and elderly subjects.[29] Normalization of *DUSP4* expression in elderly and ICL CD4$^+$ T cells restored TCR-induced ERK phosphorylation (Figures 4A and 5C-D). On day 3 after stimulation, expression levels of CD27 and CD40L in CD4$^+$ T cells from elderly individuals and patients with ICL increased after *DUSP4* knockdown (Figure 5E). These results indicate that intrinsic CD4$^+$ T-cell defects in ICL partially depend on high expression of *DUSP4* and that its silencing was able to reverse T-cell unresponsiveness.

Discussion

In this study, we found that the characteristics of T cells from 20 adults with ICL closely mimic T-cell alterations that normally occur during

Figure 4 (continued) T cells after restimulation by CD3 cross-linking for 5 minutes. Representative plots of the MFI of pERK in CD4$^+$ T cells (left). Mean pERK content in unstimulated and activated CD4$^+$ T cells + SD (right). (D) *DUSP4* and *DUSP6* mRNA levels (mean + SD, n = 9) were evaluated by quantitative PCR in healthy CD4$^+$ T cells left untreated or repeatedly stimulated with anti-CD3/anti-CD28 Abs. (E and F) Flow-cytometric analyses of CD45RA, HLA-DR, CD27, CD40L, CCR7, and CXCR4 expression on healthy CD4$^+$ T cells left untreated or after 3 rounds of stimulation. Representative dot plots or histograms (left). Background fluorescence is shown as shaded areas in F. Frequencies (mean + SD, n = 9) of naive (CD45RA$^+$CCR7$^+$) vs memory (CD45RA$^-$ CCR7$^{-/+}$), HLA-DR-expressing, and CD27-expressing CD4$^+$ T cells (E) and levels of CXCR4 and CD40L expression (F; right). Kruskal-Wallis *H* test values and associated *P* values are indicated. $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.005$, and $^{***}P < 0.0005$ compared with healthy (A), untreated (C-F), or stimulated-S1 (B) CD4$^+$ T cells (as determined using the Mann-Whitney *U* test).

From www.bloodjournal.org by guest on June 22, 2015. For personal use only.

aging. First, ICL T cells displayed a decrease in the naive subset and an expansion of the TEMRA subpopulation in the blood. This phenotype is observed in elderly individuals, for whom it could reflect the cumulative exposure of T cells to pathogens throughout life.[36,46] However, the decreased frequency of $CD45RA^+CD31^-$ in ICL $CD4^+$ T cells was mirrored by an increased fraction of $CD45RA^-CD31^-$ cells, presumably of memory/activated phenotype. Thus, the CD4 lymphocytopenia that affects predominantly the naive compartment could reflect impairment in homeostatic proliferation of naive T cells[47] and peripheral accelerated consumption associated with conversion of naive into effector/memory cells. Second, our transcriptomic study is the first to provide a comprehensive description of the gene expression profile in ICL $CD4^+$ T cells. We observed in ICL the same alterations found in the aging-related gene networks and signaling pathways of elderly individuals.[28] Third, similar to elderly T cells,[34,46] ICL T cells displayed defective TCR responses, low levels of CD27 and CD28, high expressions of natural killer cell markers, telomere shortening, and down-modulation of regulatory genes such as *TERC* and *POT1*. This profile was further implemented by the preserved ability of ICL T cells to secrete interferon-γ and by the absence of upregulation of exhaustion markers.[41,48,49] Thus, patients with ICL may encounter an accelerated T-cell senescence, rather than exhaustion.

In older adults, the loss of CD28 is clearly associated with immune senescence, and therefore, with the decline in immune responsiveness. CD28 loss occurs after persistent antigenic stimulation and after each cycle of proliferation, which in both cases leads to an accumulation of TEMRA T cells.[50] Telomere shortening throughout the life span is a result of the repeated activation of T cells by antigens, and accelerated telomere erosion is found in diseases associated with chronic immune activation, such as rheumatoid arthritis and AIDS.[38] Interestingly, ICL resembles HIV from a clinical view, but also from the pathophysiological view, with accelerated immune aging.[51,52] Several studies have demonstrated that TEMRA T cells cannot halt telomere shortening because they lack the mechanisms that compensate for telomere erosion. One such mechanism is POT1-mediated maintenance,[36] which is also altered in ICL T cells. Therefore, T-cell overstimulation may be one cause of the accelerated aging phenotype found in ICL T cells.

We detected high *DUSP4* expression in ICL $CD4^+$ T cells. This is physiologically relevant and consistent with the terminally differentiated, activated, and senescent profile associated with T cells expressing an anergic TCR.[29] Similar to DUSP6,[53] DUSP4 dephosphorylates ERK and c-Jun *N*-terminal kinases,[54,55] but also signal transducer and activator of transcription 5, and thereby regulates IL-2 signaling.[56] In vitro, we have shown that *DUSP4*, but not *DUSP6*, transcription is upregulated after successive TCR engagement in healthy $CD4^+$ T cells, suggesting it constitutes a negative feedback that prevents excessive T-cell activation by halting MAPK phosphorylation. ICL T cells are similar to elderly T cells in this respect.[29] In this context, DUSP4 is a 2-edged sword that may prevent excessive T-cell activation, but in contrast, also inhibits TCR responses. This limits T-cell responses to antigens, likely impairs the ability of T cells to provide help to B cells, and may account for the poor responses to vaccines seen in older adults and patients with ICL.[57]

DUSP4 overexpression in ICL $CD4^+$ T cells is likely secondary to chronic TCR stimulation and reflects either the activation strength of T cells or their cumulative number of cell cycles or both. This model agrees well with the anergic TCR, low telomerase activity, and short telomeres observed in ICL cells. Primitive overexpression of *DUSP4* in ICL would likely have prevented the T-cell proliferation, differentiation, and telomere shortening. Elevated *DUSP4* expression in memory $CD4^+$ T cells of older adults is caused by augmented transcription, rather than by epigenetic mechanisms. Previous works have reported that *DUSP4* expression after TCR activation depends on both the expression and activity of the transcription factor EGR1.[29,58] *EGR1* expression is higher in elderly T cells than in those of young adults. In line with this, our transcriptomic and real-time PCR approaches revealed that *EGR1* is upregulated in ICL $CD4^+$ T cells, which likely accounts for the high levels of *DUSP4* mRNA found in these cells.

Another important question concerns the mechanisms leading to chronic T-cell stimulation in ICL. Neither opportunistic infections nor a chronic viral infection such as CMV were found to be associated with T-cell changes in ICL. Although the effect of unappreciated infections cannot be excluded, we hypothesize that accelerated aging in ICL does reflect a cumulative history of T-cell stimulation induced by extrinsic or intrinsic factors. In line with a study describing a potential association between microbial dysbiosis and perturbed $CD4^+$ T-cell homeostasis in ICL,[19] microbial antigens may play a role in the aging phenotype. Alternatively, TCR dysfunction could be intrinsically a result of a dysregulated protein kinase or phosphatase downstream to the TCR. Examples of such dysregulations, including defective Lck, have been reported.[8,20,59-61] Our results implicate another intracellular target (DUSP4) in these impaired TCR responses. *DUSP4* silencing improved ICL TCR signaling in vitro and increased CD27 and CD40L expressions, which is likely to be consistent with the ability of *DUSP4* knockdown to restore T-cell-dependent B-cell responses.[29] In light of recent works pointing to mutations in *RAG1*, *MAGT1*, *ITK*, *Unc119*, and *JAK3* in pediatric or young adult cases,[3,4,8-10] it would be interesting to determine whether lymphocytopenia could be uncoupled, or not, from T-cell senescence in patients carrying a gene mutation.

Although T cells from patients with ICL and elderly subjects share several features, their CXCR4 expression levels were strikingly different, being 10-fold lower in ICL than in older adult T cells. This might reflect either CXCR4 internalization after strong TCR activation[62] or a lack of CXCR4 recycling to the plasma membrane.[12] One interpretation is that CXCR4 is re-expressed in elderly T cells because activation is less frequent or intense than in ICL T cells. This is supported by our in vitro data indicating that chronic stimulation of healthy T cells is associated with impaired membrane expression of CXCR4. The weak expression of CXCR4 detected on T cells from most of the patients, who exhibit heterogeneous clinical manifestations, suggests that loss of CXCR4 expression and function constitutes a common biologic trait of ICL.

Our study highlights that premature T-cell senescence occurs in ICL, likely as a result of chronic T-cell activation. This in part relies on the elevated expression of *DUSP4*, the modulation of which may constitute a novel therapeutic approach in ICL to improve the activity of the expanded-memory $CD4^+$ T-cell pool.

Acknowledgments

We thank Dr H. Gary (Institut Paris-Saclay d'Innovation Thérapeutique, Immunomonitoring Platform, Clamart, France) and Dr D. Gentien (Platform of Molecular Biology Facilities, Institut Curie, Paris, France) for their excellent technical assistance. We are grateful to Dr F. Bachelerie and Dr M. Espéli (INSERM UMR_S996, Clamart, France) for critical reading of the manuscript and Dr J. Harriague and Dr K. Lüttschwager (4Clinics, Paris, France) for editing the manuscript.

The study was supported by Agence Nationale de la Recherche (ANR) grant 2010-JCJC-110401 (to K.B.), and by a grant from the Programme Hospitalier de Recherche Clinique, French Ministry of Health (2009-01-55; Lympho-4). A.B., L.K., A.D., V.M., A. Dalloul,

From www.bloodjournal.org by guest on June 22, 2015. For personal use only.

and K.B. are members of the Laboratoire d'Excellence en Recherche sur le Médicament et l'Innovation Thérapeutique, supported by ANR grant ANR-10-LABX-33 under the program "Investissements d'Avenir" ANR-11-IDEX-0003-01. A.B., L.K., and A.D. were fellowship recipients from the French Ministry and from the Fondation pour la Recherche Médicale (FDT20130928127), the Laboratoire d'Excellence en Recherche sur le Médicament et l'Innovation Thérapeutique, and the Assistance Publique–Hôpitaux de Paris, respectively.

Authorship

Contribution: A.B. conceived, designed, and performed most of the experiments and contributed to manuscript writing; A.R. provided blood samples from elderly subjects and patients with ICL and reviewed the manuscript; L.K. performed some of the experiments and reviewed the manuscript; A. Desnoyer performed some of the experiments and reviewed the manuscript; P.d.l.G. analyzed microarray data and contributed to manuscript writing; V.M. provided blood samples from patients with SARC and reviewed the manuscript; O.L. provided blood samples from patients with ICL and reviewed the manuscript; A. Dalloul contributed to data analyses and manuscript writing. L.M. provided blood samples from older adult subjects and patients with ICL and reviewed the manuscript; and K.B. conceived and designed the study, found funding for the study, and wrote the manuscript.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Karl Balabanian, INSERM UMR_S996, Université Paris-Sud, LERMIT, 32 rue des Carnets, 92140 Clamart, France; e-mail: karl.balabanian@u-psud.fr.

References

1. Smith DK, Neal JJ, Holmberg SD. Unexplained opportunistic infections and CD4+ T-lymphocytopenia without HIV infection. An investigation of cases in the United States. The Centers for Disease Control Idiopathic CD4+ T-lymphocytopenia Task Force. *N Engl J Med*. 1993;328(6):373-379.
2. Ahmad DS, Esmadi M, Steinmann WC. Idiopathic CD4 Lymphocytopenia: Spectrum of opportunistic infections, malignancies, and autoimmune diseases. *Avicenna J Med*. 2013;3(2):37-47.
3. Li FY, Chaigne-Delalande B, Kanellopoulou C, et al. Second messenger role for Mg2+ revealed by human T-cell immunodeficiency. *Nature*. 2011; 475(7357):471-476.
4. Kuijpers TW, Ijspeert H, van Leeuwen EM, et al. Idiopathic CD4+ T lymphopenia without autoimmunity or granulomatous disease in the slipstream of RAG mutations. *Blood*. 2011; 117(22):5892-5896.
5. Frühwirth M, Clodi K, Heitger A, Neu N. Lymphocyte diversity in a 9-year-old boy with idiopathic CD4+ T cell lymphocytopenia. *Int Arch Allergy Immunol*. 2001;125(1):80-85.
6. Zonios DI, Falloon J, Bennett JE, et al. Idiopathic CD4+ lymphocytopenia: natural history and prognostic factors. *Blood*. 2008;112(2):287-294.
7. Zonios DI, Falloon J, Huang CY, Chaitt D, Bennett JE. Cryptococcosis and idiopathic CD4 lymphocytopenia. *Medicine (Baltimore)*. 2007; 86(2):78-92.
8. Gorska MM, Alam R. A mutation in the human Uncoordinated 119 gene impairs TCR signaling and is associated with CD4 lymphopenia. *Blood*. 2012;119(6):1399-1406.
9. Serwas NK, Cagdas D, Ban SA, et al. Identification of ITK deficiency as a novel genetic cause of idiopathic CD4+ T-cell lymphopenia. *Blood*. 2014;124(4):655-657.
10. Ban SA, Salzer E, Eibl MM, et al. Combined immunodeficiency evolving into predominant CD4+ lymphopenia caused by somatic chimerism in JAK3. *J Clin Immunol*. 2014;34(8):941-953.
11. Régent A, Autran B, Carcelain G, et al; French Idiopathic CD4 T Lymphocytopenia Study Group. Idiopathic CD4 lymphocytopenia: clinical and immunologic characteristics and follow-up of 40 patients. *Medicine (Baltimore)*. 2014;93(2):61-72.
12. Scott-Algara D, Balabanian K, Chakrabarti LA, et al. Idiopathic CD4+ T-cell lymphocytopenia is associated with impaired membrane expression of the chemokine receptor CXCR4. *Blood*. 2010; 115(18):3708-3717.
13. Isgrò A, Sirianni MC, Gramiccioni C, Mezzaroma I, Fantauzzi A, Aiuti F. Idiopathic CD4+ lymphocytopenia may be due to decreased bone marrow clonogenic capability. *Int Arch Allergy Immunol*. 2005;136(4):379-384.
14. Cervera C, Fernández-Avilés F, de la Calle-Martin O, et al. Non-myeloablative hematopoietic stem cell transplantation in the treatment of severe idiopathic CD4+ lymphocytopenia. *Eur J Haematol*. 2011;87(1):87-91.
15. Puronen CE, Thompson WL, Imamichi H, et al. Decreased interleukin 7 responsiveness of T lymphocytes in patients with idiopathic CD4 lymphopenia. *J Infect Dis*. 2012;205(9): 1382-1390.
16. Bugault F, Benati D, Mouthon L, et al. Altered responses to homeostatic cytokines in patients with idiopathic CD4 lymphocytopenia. *PLoS ONE*. 2013;8(1):e55570.
17. Laurence J, Mitra D, Steiner M, Lynch DH, Siegal FP, Staiano-Coico L. Apoptotic depletion of CD4+ T cells in idiopathic CD4+ T lymphocytopenia. *J Clin Invest*. 1996;97(3):672-680.
18. Roger PM, Bernard-Pomier G, Counillon E, Breittmayer JP, Bernard A, Dellamonica P. Overexpression of Fas/CD95 and Fas-induced apoptosis in a patient with idiopathic CD4+ T lymphocytopenia. *Clin Infect Dis*. 1999;28(5): 1012-1016.
19. Lee PI, Ciccone EJ, Read SW, et al. Evidence for translocation of microbial products in patients with idiopathic CD4 lymphocytopenia. *J Infect Dis*. 2009;199(11):1664-1670.
20. Hubert P, Bergeron F, Ferreira V, et al. Defective p56Lck activity in T cells from an adult patient with idiopathic CD4+ lymphocytopenia. *Int Immunol*. 2000;12(4):449-457.
21. Sweiss NJ, Salloum R, Gandhi S, et al. Significant CD4, CD8, and CD19 lymphopenia in peripheral blood of sarcoidosis patients correlates with severe disease manifestations. *PLoS ONE*. 2010; 5(2):e9088.
22. Perez-Patrigeon S, Vingert B, Lambotte O, et al. HIV infection impairs CCR7-dependent T-cell chemotaxis independent of CCR7 expression. *AIDS*. 2009;23(10):1197-1207.
23. Biajoux V, Bignon A, Freitas C, et al. Expression of CXCL12 receptors in B cells from Mexican Mestizos patients with systemic Lupus erythematosus. *J Transl Med*. 2012;10:251.
24. Meyer RG, Britten CM, Wehler D, et al. Prophylactic transfer of CD8-depleted donor lymphocytes after T-cell-depleted reduced-intensity transplantation. *Blood*. 2007;109(1): 374-382.
25. de la Grange P, Dutertre M, Martin N, Auboeuf D. FAST DB: a website resource for the study of the expression regulation of human gene products. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(13):4276-4284.
26. de la Grange P, Dutertre M, Correa M, Auboeuf D. A new advance in alternative splicing databases: from catalogue to detailed analysis of regulation of expression and function of human alternative splicing variants. *BMC Bioinformatics*. 2007;8: 180.
27. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Revised surveillance case definition for HIV infection—United States, 2014. *MMWR Recomm Rep*. 2014;63(RR-03):1-10.
28. Chen G, Lustig A, Weng NP. T cell aging: a review of the transcriptional changes determined from genome-wide analysis. *Front Immunol*. 2013;4: 121.
29. Yu M, Li G, Lee WW, et al. Signal inhibition by the dual-specific phosphatase 4 impairs T cell-dependent B-cell responses with age. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109(15):E879-E888.
30. Kovanen PE, Rosenwald A, Fu J, et al. Analysis of gamma c-family cytokine target genes. Identification of dual-specificity phosphatase 5 (DUSP5) as a regulator of mitogen-activated protein kinase activity in interleukin-2 signaling. *J Biol Chem*. 2003;278(7):5205-5213.
31. Li G, Yu M, Lee WW, et al. Decline in miR-181a expression with age impairs T cell receptor sensitivity by increasing DUSP6 activity. *Nat Med*. 2012;18(10):1518-1524.
32. Kovaiou RD, Weiskirchner I, Keller M, Pfister G, Cioca DP, Grubeck-Loebenstein B. Age-related differences in phenotype and function of CD4+ T cells are due to a phenotypic shift from naive to memory effector CD4+ T cells. *Int Immunol*. 2005;17(10):1359-1366.
33. Cané S, Ponnappan S, Ponnappan U. Altered regulation of CXCR4 expression during aging contributes to increased CXCL12-dependent chemotactic migration of CD4(+) T cells. *Aging Cell*. 2012;11(4):651-658.
34. Koch S, Larbi A, Derhovanessian E, Ozcelik D, Naumova E, Pawelec G. Multiparameter flow cytometric analysis of CD4 and CD8 T cell subsets in young and old people. *Immun Ageing*. 2008;5:6.
35. Lee NS, Barber L, Kanchwala A, et al. Low levels of NF-κB/p65 mark anergic CD4+ T cells and correlate with disease severity in sarcoidosis. *Clin Vaccine Immunol*. 2011;18(2):223-234.
36. Moro-García MA, Alonso-Arias R, López-Larrea C. Molecular mechanisms involved in the aging of

From www.bloodjournal.org by guest on June 22, 2015. For personal use only.

the T-cell immune response. *Curr Genomics*. 2012;13(8):589-602.

37. Kilpatrick RD, Rickabaugh T, Hultin LE, et al. Homeostasis of the naive CD4+ T cell compartment during aging. *J Immunol*. 2008; 180(3):1499-1507.
38. Effros RB. Telomere/telomerase dynamics within the human immune system: effect of chronic infection and stress. *Exp Gerontol*. 2011;46(2-3): 135-140.
39. Weng NP, Akbar AN, Goronzy J. CD28(-) T cells: their role in the age-associated decline of immune function. *Trends Immunol*. 2009;30(7):306-312.
40. Hohensinner PJ, Goronzy JJ, Weyand CM. Telomere dysfunction, autoimmunity and aging. *Aging Dis*. 2011;2(6):524-537.
41. Akbar AN, Henson SM. Are senescence and exhaustion intertwined or unrelated processes that compromise immunity? *Nat Rev Immunol*. 2011;11(4):289-295.
42. Collins MH, Henderson AJ. Transcriptional regulation and T cell exhaustion. *Curr Opin HIV AIDS*. 2014;9(5):459-463.
43. Shin H, Blackburn SD, Intlekofer AM, et al. A role for the transcriptional repressor Blimp-1 in CD8(+) T cell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity*. 2009;31(2):309-320.
44. Huang CY, Tan TH. DUSPs, to MAP kinases and beyond. *Cell Biosci*. 2012;2(1):24.
45. Goronzy JJ, Li G, Yu M, Weyand CM. Signaling pathways in aged T cells - a reflection of T cell differentiation, cell senescence and host environment. *Semin Immunol*. 2012;24(5): 365-372.
46. Goronzy JJ, Weyand CM. Understanding immunosenescence to improve responses to vaccines. *Nat Immunol*. 2013;14(5):428-436.
47. Kohler S, Wagner U, Pierer M, et al. Post-thymic in vivo proliferation of naive CD4+ T cells constrains the TCR repertoire in healthy human adults. *Eur J Immunol*. 2005;35(6): 1987-1994.
48. Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P, et al. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature*. 2006;443(7109):350-354.
49. Fernandez S, French MA, Price P. Immunosenescent CD57+CD4+ T-cells accumulate and contribute to interferon-γ responses in HIV patients responding stably to ART. *Dis Markers*. 2011;31(6):337-342.
50. Weyand CM, Brandes JC, Schmidt D, Fulbright JW, Goronzy JJ. Functional properties of CD4+ CD28- T cells in the aging immune system. *Mech Ageing Dev*. 1998;102(2-3):131-147.
51. Palmer BE, Blyveis N, Fontenot AP, Wilson CC. Functional and phenotypic characterization of CD57+CD4+ T cells and their association with HIV-1-induced T cell dysfunction. *J Immunol*. 2005;175(12):8415-8423.
52. Le Saux S, Weyand CM, Goronzy JJ. Mechanisms of immunosenescence: lessons from models of accelerated immune aging. *Ann N Y Acad Sci*. 2012;1247:69-82.
53. Caunt CJ, Keyse SM. Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs): shaping the outcome of MAP kinase signalling. *FEBS J*. 2013;280(2): 489-504.
54. Guan KL, Butch E. Isolation and characterization of a novel dual specific phosphatase, HVH2, which selectively dephosphorylates the mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*. 1995; 270(13):7197-7203.
55. Chu Y, Solski PA, Khosravi-Far R, Der CJ, Kelly K. The mitogen-activated protein kinase phosphatases PAC1, MKP-1, and MKP-2 have unique substrate specificities and reduced activity in vivo toward the ERK2 sevenmaker mutation. *J Biol Chem*. 1996;271(11): 6497-6501.
56. Huang CY, Lin YC, Hsiao WY, Liao FH, Huang PY, Tan TH. DUSP4 deficiency enhances CD25 expression and CD4+ T-cell proliferation without impeding T-cell development. *Eur J Immunol*. 2012;42(2):476-488.
57. Boraschi D, Aguado MT, Dutel C, et al. The gracefully aging immune system. *Sci Transl Med*. 2013;5(185):185ps8.
58. Berasi SP, Huard C, Li D, et al. Inhibition of gluconeogenesis through transcriptional activation of EGR1 and DUSP4 by AMP-activated kinase. *J Biol Chem*. 2006;281(37): 27167-27177.
59. Stanford SM, Rapini N, Bottini N. Regulation of TCR signalling by tyrosine phosphatases: from immune homeostasis to autoimmunity. *Immunology*. 2012;137(1):1-19.
60. Rhee I, Veillette A. Protein tyrosine phosphatases in lymphocyte activation and autoimmunity. *Nat Immunol*. 2012;13(5):439-447.
61. Hauck F, Randriamampita C, Martin E, et al. Primary T-cell immunodeficiency with immunodysregulation caused by autosomal recessive LCK deficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;130(5):1144-1152.
62. Kumar A, Humphreys TD, Kremer KN, et al. CXCR4 physically associates with the T cell receptor to signal in T cells. *Immunity*. 2006;25(2): 213-224.

From www.bloodjournal.org by guest on June 22, 2015. For personal use only.

blood 2015 125: 2507-2518
doi:10.1182/blood-2014-08-598565 originally published online March 2, 2015

DUSP4-mediated accelerated T-cell senescence in idiopathic CD4 lymphopenia

Alexandre Bignon, Alexis Régent, Laurence Klipfel, Aude Desnoyer, Pierre de la Grange, Valérie Martinez, Olivier Lortholary, Ali Dalloul, Luc Mouthon and Karl Balabanian

Updated information and services can be found at:
http://www.bloodjournal.org/content/125/16/2507.full.html

Articles on similar topics can be found in the following Blood collections
Immunobiology (5313 articles)

Information about reproducing this article in parts or in its entirety may be found online at:
http://www.bloodjournal.org/site/misc/rights.xhtml#repub_requests

Information about ordering reprints may be found online at:
http://www.bloodjournal.org/site/misc/rights.xhtml#reprints

Information about subscriptions and ASH membership may be found online at:
http://www.bloodjournal.org/site/subscriptions/index.xhtml

Blood (print ISSN 0006-4971, online ISSN 1528-0020), is published weekly by the American Society of Hematology, 2021 L St, NW, Suite 900, Washington DC 20036.
Copyright 2011 by The American Society of Hematology; all rights reserved.

3) *Curriculum Vitae*

Aude DESNOYER

DOCTEUR EN PHARMACIE •
DES DE PHARMACIE HOSPITALIERE •
DOCTORANTE EN IMMUNOLOGIE •
Née le 04 avril 1985
148 rue de Lourmel • 75015 Paris
Tél : 06 78 15 86 38 • Messagerie : audedesnoyer@gmail.com

Parcours universitaire

2012-2015	**Thèse de 3ème cycle** École Doctorale ED425 Innovation thérapeutique. Faculté de Pharmacie de Châtenay-Malabry – Paris-Saclay (3ème année en cours)
2009-2014	**Diplôme d'études spécialisées** Pharmacie hospitalière – Pratique et Recherche. Assistance Publique des Hôpitaux de Paris
2003-2014	**Doctorat en pharmacie** Faculté de Pharmacie de Châtenay-Malabry – Paris-Sud (mention très bien)
2012	**Master 2** Biologie Santé spécialité Immunologie. Faculté de Médecine du Kremlin-Bicêtre – Paris-Sud (mention très bien, major de promotion) **DIU de statistiques appliquées à la médecine (CESAM) :** UPMC – Paris 6
2010	**Master 1** Médicaments et autres produits de santé, spécialité innovation thérapeutique. Faculté de Pharmacie de Châtenay-Malabry – Paris-Sud
2003	**Baccalauréat** Scientifique mention Bien. Lycée de Montgeron

Expérience professionnelle

ACTIVITES EN PHARMACIE HOSPITALIERE

Nov 2014 – Oct 15 **Année médaille** (en cours)- Hôpital Bichât, Paris

- *Evaluation de l'impact d'un traitement par lénalidomide chez des patients atteints d'une maladie de Kaposi liée au VIH (NCT01282047, protocole ANRS 154, LENAKAP).*
- *Analyse des interactions médicamenteuses potentielles entre les antirétroviraux et le lénalidomide, Dr G. Peytavin.*

Nov 2013 – Oct 14 **Stages extrahospitaliers**- INSERM UMR996, Clamart

- *Projet : Expression et rôle des cytokines et chimiokines dans la maladie de Kaposi, Dr V. Martinez, Dr K. Balabanian.*

Mai – Oct 2013 **Inter-CHU : assistance pharmaceutique -** Hôpitaux Universitaires de Genève

- *Participation aux activités de l'unité d'assistance pharmaceutique, Dr C Fonzo-Christe., Pr P. Bonnabry*
- *Projet : PIM-Check© : élaboration d'un outil de détection des prescriptions inappropriées chez l'adulte admis en médecine interne, Dr B. Guignard, Pr P. Bonnabry.*

Nov 2012 – Avr 13 **Pharmacie clinique : néphrologie**- HEGP, Paris

- *Service Pharmacie, Service de néphrologie, Pr P. Prognon, Pr E. Thervet.*
- *Projet : Élaboration de recommandations pour la prise en charge de la tuberculose pulmonaire chez les patients insuffisants rénaux hospitalisés à l'HEGP.*

Mai - Oct 2011 **Unité de reconstitution des cytotoxiques, Oncologie pédiatrique** Hôpital R. Debré, Paris

- *Unité de reconstitution centralisée des cytotoxiques, Préparatoire, Dr T. Storme, Pr F. Brion.*
- *Projet : Développement et mise en place d'une consultation pharmaceutique dans l'unité d'hémato-oncologie pédiatrique, Dr J. Roupret-Serzec.*

Nov 2010 – Avr 11 **Pharmacie clinique : cardiologie-** Hôpital A Béclère, Clamart

- *Service Pharmacie-essais cliniques, Service de Cardiologie, Dr A. Rieutord, Pr M. Slama.*
- *Projets : Mise en place et évaluation dans trois services cliniques d'un historique médicamenteux, Pérennisation de la réalisation de « consultations AVK », élaboration d'un atelier de formation des pharmaciens sur la prise en charge des patients recevant des AVK.*

Mai – Oct 2010 **Gestion des dispositifs médicaux-** Hôpital Pitié-Sapétrière, Paris

- *Unité des Dispositifs Médicaux Stériles, Dr C. Fargeot, Pr C. Fernandez.*
- *Projets : Élaboration d'un guide de bonnes pratiques en nutrition entérale, Audit de bonnes pratiques en nutrition entérale chez l'adulte, Dr C. Fargeot.*

Nov 2009 – avr 10 **Suivi thérapeutique des antiviraux-** Hôpital Bichât, Paris

- *Laboratoire de Pharmacologie des antiviraux, Dr G. Peytavin, Pr P. Arnaud.*
- *Projet : Étude du la cinétique du darunavir, de maraviroc et de l'interaction bexarotene/efavirenz, Dr G. Peytavin.*

Juil - Sept 2008 **Externat en pharmacie clinique-** Jewish General Hospital, Montréal

- *Participation au projet « medication reconciliation », Dr J. Pepin (Hôpital anglophone).*

Oct 2007 – Juin 2008 **Externat en pharmacie Hôpital** - Necker Enfants Malades, Paris

ACTIVITÉS DE RECHERCHE

2012-2015 **Thèse de 3ème cycle Pharmacologie appliquée à l'Immunologie** (en cours)- INSERM UMR_S996, Clamart

- *Expression et rôle des cytokines et chimiokines dans la maladie de Kaposi liée au VIH. Influence d'un traitement par lénalidomide (NCT01282047, protocole ANRS 154, LENAKAP), Dr V. Martinez, Dr K. Balabanian.*

2011-2012 **Master 2 Biologie Santé spécialité Immunologie-** INSERM UMR_S996

- *Expression cutanée de CXCL12/CXCR4/CXCR7 chez des patients atteints d'une maladie de Kaposi, Dr V. Martinez, Dr K. Balabanian.*

2009-2010 **Master 1 médicaments et autres produits de santé,** spécialité biologie cellulaire, microbiologie et innovation thérapeutique– Hôpital Bichât, Paris

- *Etude du passage transplacentaire des antirétroviraux, Dr G. Peytavin.*

ENCADREMENT – ENSEIGNEMENT

2011-2015 **Cours aux étudiantes sages-femmes des ESF de l'Hôpital Foch et Saint-Antoine** Pharmacologie spécialisée : grossesse, allaitement et médicaments, pharmacologie du nouveau-né, antalgiques, antipyrétiques, anti-inflammatoires, antiviraux, antiseptiques, neurologie, système digestif, vitamines et oligo-éléments. (30h de cours + 5 partiels)

2009-2015 **Encadrement d'externes en pharmacie**

2012-2013 **Encadrement d'une étudiante en master 2** Biologie Santé spécialité Immunologie.

Titres et travaux

Publications internationales avec comité de relecture

1. Pharmacokinetic of dolutegravir in a premature neonate after HIV treatment intensification during pregnancy. Pain JB, Le M, Caseris M, Amiel C, Lassel L, Charpentier C, **Desnoyer A**, *et al.* AAC 2015 Apr 6 (IF : 4,6)

2. Dual-specific phosphatase 4-mediated defective TCR signaling and accelerated aging in Idiopathic $CD4^{+}$T-cell Lymphopenia. Bignon A, Régent A, Klipfel L, **Desnoyer A**, *et al.* Blood 2015 Mar 2 (IF : 9,8)

3. The relevance of the chemokine receptor ACKR3/CXCR7 on CXCL12-mediated effects in cancers with a focus on virus-related cancers. Freitas C, **Desnoyer A**, Meuris F, *et al.* Cytokine Growth Factor Rev. 2014 Jun;25(3):307-16 (IF : 8,8)

4. Promoting pharmaceutical care services: a case report. Curatolo N, **Desnoyer A**, Chaumais MC, *et al.* Eur J Hosp Pharm 2012;19:4 373-374

5. A process-oriented approach to medication reconciliation at admission in a surgery department. Curatolo N, Assoupka J, **Desnoyer A,** et *al.* Eur J Hosp Pharm 2012;19:2 98-98

6. Deleterious pharmacokinetics interaction between bexarotene and efavirenz. **Desnoyer A**, Al Kaied F, Descamps D, et *al.* AIDS 2010;10;24(14):2296-8 (IF : 6.4)

Publications nationales avec comité de relecture

7. Dispositif de formation d'une équipe pharmaceutique à la consultation d'accompagnement d'un patient sous traitement anticoagulant oral. Barbier E, Chaumais MC, **Desnoyer A**, *et al.* Pédagogie médicale 2013; 14 :4,269-284

8. Antiretrovirals transfer across the human placenta. **Desnoyer A**, Moisan A, Peytavin G. Antibiotiques 2010 ; 12,228-234

Publications nationales sans comité de relecture

9. Parcours de santé des personnes âgées. Le réseau « Osmose » accompagne les patients sortants. Chauny JV, Desnoyer A, Roques D. Le Moniteur Hospitalier 2013 ; 256 :05

10. L'ETP c'est la gestion du risque clinique. Curatolo N, **Desnoyer A**, Hache G, *et al.* Le Moniteur Hospitalier 2012 ; 247 : 16

Invitation à communiquer dans un séminaire international

1. Inspired by STOPP/START: a new prescription-screening tool for adult patients – Seminar M1. 20th Congress of the EAHP, Mar 2015

2. Student to Hospital Pharmacist – Breaking down the barriers. 18th Congress of the EAHP, Paris, France, Mar 2013 www.eahp.eu/congresses/speaker/desnoyer-aude

Communications orales internationales (*Intervenant)

3. Sofosbuvir in haemodialysis: 400 mg daily or only the day of hemodialysis? **Desnoyer A***, Pospai D, Lê M, *et al.* 16th International Workshop on Clinical Pharmacology of HIV and HepatitisTherapy, Sorrento, Italy, May 2015

4. Développement d'un outil francophone de détection des prescriptions inappropriées chez l'adulte hospitalisé en médecine interne. **Desnoyer A***, Guignard B, Blanc AL, et *al.* 19èmes journées franco-suisses de pharmacie hospitalière, Macon, France, Mai 2015 (1er prix de présentation orale) http://jfsph.net/files/uploads/Outil_detection_prescription_inapprorpi%C3%A9es_ADesnoyer.pdf

5. Implementation and assessment of a pharmacist based medication history process in three clinical wards. **Desnoyer A***, Curatolo N, Courtin C, et *al.*40th ESCP, Dublin, Ireland, Oct 2011

6. Placental transfer of antiretroviral drugs in HIV-infected women: a retrospective study from 2002-2009. Moisan A, **Desnoyer A,** Bourgeois-Moine A, et *al**. 11th International Workshop on Clinical Pharmacology of HIV Therapy, Sorrento, Italy, Apr 2010

Communications nationales (*Intervenant)

7. Intérêt du recueil systématique d'un historique médicamenteux par l'externe en pharmacie : étude pilote dans un service de chirurgie viscérale. Curatolo N*, Regnault S, **Desnoyer A,** et *al.* SFAR, Paris, France, Sept 2011

8. Réévaluation des dispositifs de trachéotomie : critères de choix et bonnes pratiques d'utilisation. **Desnoyer A,** Nguyen-Kim Luc, Fargeot C*. 20èmes journées nationales sur les dispositifs médicaux Europharmat, Toulouse, France, Oct 2010

Communications affichées

1. Which dose of daclatasvir should be used with darunavir/ritonavir 800/100 once-daily containing regimen in HIV/HCV co-infected patients. **Desnoyer A,** Lê M, Belissa E, *et al.* 16th International Workshop on Clinical Pharmacology of HIV and Hepatitis Therapy, Sorrento, Italy, May 2015

2. Dolutegravir drug interaction with DRV/r or ATV/r: impact on its pharmacokinetic? Lê M, Pain JB, **Desnoyer A**, *et al.* 16th International Workshop on Clinical Pharmacology of HIV and Hepatitis Therapy, Sorrento, Italy, May 2015

3. The CXCL12/CXCR4-CXCR7 pathway, a trio involved in Kaposi's sarcoma pathogenesis. **Desnoyer A**, Gaudin F, Carlotti A, *et al.* CROI, Seattle, Washington, USA, Feb 2015

4. Expression cutanée du trio CXCL12/CXCR4-CXCR7 chez des patients atteints d'une maladie de Kaposi associée à une infection par le VIH. **Desnoyer A**, Gaudin F, Carlotti A, *et al.* 10ème Université Jeunes Chercheurs du Sidaction, Carry-Le-Rouet, France, Oct 2012

5. Validation d'une méthodologie de formation : application aux « consultations AVK». Barbier E, **Desnoyer A**, Skiredj A, *et al.* 7ème rencontres convergences santé hôpital, Ajaccio, France, Sept. 2012

6. Development and implementation of a pharmaceutical consultation in a pediatric hematology unit: a pilot study. **Desnoyer A**, Baruchel A, Brion F, et *al.* 17th EAHP, Milan, Italy, Mar 2012 www.eahp.eu/sites/default/files/cpc090.pdf

7. A process-oriented approach to medication reconciliation at admission in a surgery department. Curatolo N,Assoupka J, **Desnoyer A,** et *al.* 17th EAHP, Milan, Italy, Mar 2012 http://ejhp.bmj.com/content/19/2/98.2

8. Évaluation des modalités d'utilisation des dispositifs médicaux de nutrition entérale, au sein du Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière. **Desnoyer A**, Nguyen-Kim L, Laurent AC, *et al.* 21èmes journées Europharmat, Lyon, France, Oct 2011 www.euro-pharmat.com/documents/13lyon.pdf

9. Variability of Darunavir Plasma Concentrations and relationships with adherence and virological response in the MONOI-ANRS136 Trial.**Desnoyer A**, Duvivier C, Katlama C, et *al.* 12th International Workshop on Clinical Pharmacology of HIV Therapy, Miami, Florida Apr 2011

10. Unconformities in Medical Devices Clinical Trials. Review of 47 clinical trials set up in hospital environment.Nguyen-Kim L, Beaussier H, **Desnoyer A**, et *al.* 39th European Symposium on Clinical Pharmacy and 13ème congrès de la SFPC, Lyon, France, Oct 2010

11. Doit-on booster Maraviroc par ritonavir? Etude d'interaction pharmacocinétique. **Desnoyer A**, Melica G, Canestri A, et *al.*11ème JNI, Montpellier, France, Juin 2010

Comité de rédaction

Rédactrice en chef associée du Journal de Pharmacie Clinique

Activités de relecture

Relecteur pour les Journaux : Drugs and Aging (IF : 2.6), (1 article)
Journal de Pharmacie Clinique (2 articles)

Mémoires et thèses

Mémoire de DES : « Élaboration d'un outil international de détection des prescriptions inappropriées destiné aux adultes en médecine interne » (mention très bien)

Mémoire de Master 2 : « Expression cutanée de CXCL12, CXCR4 et CXCR7 chez des patients atteints d'une maladie de Kaposi associée à une infection par le Virus de l'Immunodéficience Humaine (protocole Lenakap, ANRS 154) » (mention très bien)

Autres compétences et intérêts

Langues : anglais (niveau du Cadre européen commun : C1), allemand (scolaire).
Activités associatives :

- Représentante des doctorants au conseil scientifique de la faculté Paris-Sud 2014-15,
- Vice présidente PH-PR du Syndicat des Internes en Pharmacie des Hôpitaux d'Ile de France (SIPHIF) 2011-13, Trésorière 2010-11, Membre active 2009-10, 2013-14,
- Participation aux équipes économales des salles de garde de R Debré et d'A. Béclère 2010-11.

Informatique hospitalière : Phedra, Pharma, SAP, Chimio, Propharma, Copilote, Actipidos, PCS, DxCare.
Sport : volley-ball, escalade.

Prix et Distinctions

2015	Premier prix de communication, 19èmes Journées franco-suisses de pharmacie hospitalière
	Nominée au Trophée de l'interne innovant 2015 d'Apinnov
2014	Prix de l'Internat en Pharmacie des Hôpitaux de Paris,
	Prix René et André Fabre de l'Académie nationale de Pharmacie
	Médaille d'or du Concours des prix de l'internat de l'Assistance Publique des Hôpitaux de Paris
2013	Obtention d'un financement pour recherches complémentaires dans le cadre de l'essai clinique ANRS 154 Lenakap (2ème appel d'offre de l'ANRS 2013)
2012	Lauréate du master 2 biologie santé spécialité immunologie en qualité de Major
2011	Obtention de l'année recherche
	Lauréate de l'opération Journées Jeunes Spécialistes en Cardiologie de la SFC
2009	Reçue première au DES PH-PR Ile de France
2008	Mention honorable 5ème année de Pharmacie
2007	Lauréate de la Faculté de Paris-Sud XI en qualité de Major en 4ème année de Pharmacie
2006	Lauréate de la Faculté de Paris-Sud XI en qualité de seconde en 3ème année de Pharmacie

◆ Etude de l'impact clinique et immunologique d'un traitement par lénalidomide dans la maladie de Kaposi liée au VIH

L'objectif de cette thèse menée dans le cadre de l'essai clinique ANRS 154 Lenakap a été d'étudier l'impact clinique et immunologique d'un traitement par lénalidomide dans la maladie de Kaposi liée au VIH (MK-VIH) et d'identifier de nouveaux biomarqueurs de la pathologie, notamment à travers l'étude du trio de chimiokine et récepteurs CXCL12/CXCR4-CXCR7. A l'heure actuelle, aucun traitement curatif de la MK-VIH n'est disponible. Le lénalidomide, un immunomodulateur pléïotrope ciblant différentes anomalies rencontrées dans la MK, constitue une perspective thérapeutique dans cette indication. L'interprétation de la réponse clinique des patients au traitement au cours de l'essai clinique ANRS 154 Lenakap est difficile, notamment en raison de discordances entre les scores d'évaluation utilisés. Néanmoins, nos résultats ont montré une bonne tolérance du lénalidomide chez les patients inclus, infectés par le VIH et traités par antirétroviraux. Aucune interaction médicamenteuse pharmacologiquement ou cliniquement significative n'a été détectée chez les patients, ouvrant de nouvelles perspectives pour la prise en charge de ces derniers, y compris dans d'autres indications, tels que le myélome multiple et les syndromes myélodysplasiques. Nous avons également mis en évidence l'impact du TNF-α, de l'IFN-γ et de l'IL-10 dans la progression de la MK-VIH.
L'ensemble des mécanismes physiopathologiques de la MK n'est pas encore élucidé et nous ne disposons actuellement d'aucun biomarqueur, de suivi d'évolution, ou de réponse au traitement dans cette indication. Des données de la littérature suggèrent une implication du trio CXCL12/CXCR4-CXCR7 dans la physiopathologie de la MK-VIH. Nos analyses immunohistochimiques et par immunofluorescence, couplées à la mise au point d'une technique de quantification sur lames numérisées, ont permis de mettre en évidence la présence augmentée des protéines CXCL12/CXCR4-CXCR7 dans les lésions de MK. Les corrélations positives retrouvées entre les protéines du trio et le stade des lésions, la présence du virus sous forme latente, le facteur de croissance VEGF et la prolifération cellulaire, suggèrent de possibles effets autocrines et paracrines du trio à l'origine d'une propagation tissulaire du virus et d'effets prolifératifs et pro-angiogéniques dans le MK. Cette étude suggère pour la première fois le rôle de biomarqueur tissulaire, témoin du processus physiopathologique de la MK, pour le trio CXCL12/CXCR4-CXCR7. En revanche, CXCL12 ne semble pas être un biomarqueur plasmatique à la fois de la physiopathologie ou de la progression de la MK. Enfin, cette étude confirme l'état pro-inflammatoire des patients infectés par le VIH et rapporte une immunomodulation particulière chez les patients MK-VIH avec des taux plasmatiques de TNF-α, IL-6, IFN-γ et IL-10 augmentés, peut-être à l'origine du développement et de la progression de la maladie.

◆ Clinical and immunological impact of lenalidomide in patients with HIV-associated Kaposi's sarcoma receiving antiretroviral therapy

The objective of my PhD works, conducted as part of the clinical trial ANRS 154 Lenakap, was to evaluate the clinical and immunological impact of lenalidomide in patients with HIV-associated Kaposi's sarcoma (AIDS-KS) and to identify new biomarkers of disease, particularly through the study of the trio CXCL12/CXCR4-CXCR7
So far, no cure for the AIDS-KS is available. Lenalidomide, an oral immunomodulating agent targeting various anomalies observed in KS is a therapeutic perspective in this indication. Evaluation of clinical response to treatment in the ANRS 154 Lenakap clinical trial was difficult, especially because of discrepancies observed between assessments scores used to evaluate this parameter. Nevertheless, lenalidomide was well tolerated in patients infected with HIV and treated with antiretroviral drugs. We detected no pharmacologically or clinically significant drug-drug interactions between lenalidomide and antiretroviral drugs, opening new perspectives for the treatment of HIV-positive patients, including other indications such as multiple myeloma and myelodysplastic syndromes. We also highlighted the impact of TNF-α, IFN-γ and IL-10 in the progression of AIDS-KS.
All pathophysiological mechanisms of KS are not yet elucidated, and so far, no biomarker is available to monitor evolution, or response to treatment in this indication. Some data suggest an involvement of the trio CXCL12/CXCR4-CXCR7 in KS pathophysiology. Our immunohistochemical and immunofluorescence analysis, coupled to a technique for quantification of digitized slides, have allowed us to demonstrate the over-expression of CXCL12, CXCR4 and CXCR7 proteins in KS cutaneous lesions. Moreover, we reported for the first time the simultaneous *in situ* up-regulation of CXCL12, CXCR4 and CXCR7 in AIDS- and classic-KS. These deregulations correlated with lesion severity, latent viral load, proliferation and angiogenesis. This suggests a possible autocrine and paracrine effects of the trio leading to the virus propagation, the cells proliferation and the angiogenic process observed in KS. Our results further indicate that the trio could be used in KS rather as a histologic than a circulating biomarker. Finally, this study confirms the pro-inflammatory state of HIV-infected patients and highlights a specific immune modulation in AIDS-KS patients with increased TNF-α, IL-6, IFN-γ and IL-10 plasma levels. This microenvironment may participate in the disease progression.

◆ **Mots clefs :** maladie de Kaposi ; VIH ; lénalidomide ; CXCL12 ; CXCR4 ; CXCR7

◆ **Laboratoire de rattachement :**
INSERM UMR_S996,
Cytokines, chimiokines et immunopathologie
32, rue des Carnets,
92140 Clamart

◆ **Ecole Doctorale**
ED425 : Innovation Thérapeutique,
Pôle : Immunologie et biothérapies
Université Paris-Sud 11, UFR
« Faculté de pharmacie de Châtenay-Malabry »
92296 Châtenay-Malabry Cedex