



**HAL**  
open science

**Valeur prédictive du récepteur NKp30 dans la réponse à l'imatinib mesylate des tumeurs stromales gastrointestinales et identification d'un nouveau mécanisme inhibiteur des cellules Natural Killer par la voie  $TNF\alpha$ /TNFR2/BIRC3/TRAF1**

Alexandre Ivagnes

► **To cite this version:**

Alexandre Ivagnes. Valeur prédictive du récepteur NKp30 dans la réponse à l'imatinib mesylate des tumeurs stromales gastrointestinales et identification d'un nouveau mécanisme inhibiteur des cellules Natural Killer par la voie  $TNF\alpha$ /TNFR2/BIRC3/TRAF1. Cancer. Université Paris Saclay (COMUE), 2017. Français. NNT : 2017SACLS237 . tel-01625085

**HAL Id: tel-01625085**

**<https://theses.hal.science/tel-01625085>**

Submitted on 27 Oct 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.

Valeur prédictive du récepteur NKp30 dans la réponse à l'imatinib mesylate des tumeurs stromales gastrointestinales et identification d'un nouveau mécanisme inhibiteur des cellules Natural Killer par la voie TNF $\alpha$ /TNFR2/BIRC3/TRAF1

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay  
préparée à l'Université Paris-Sud

ECOLE DOCTORALE N° 582  
CBMS Cancérologie : biologie - médecine – santé

Spécialité de doctorat : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Thèse présentée et soutenue à Gustave Roussy Cancer Campus,  
le 29 septembre 2017, par

**Alexandre IVAGNES**

Composition du Jury :

<b>M. GALANAUD Pierre</b> Pr émérite, Université Paris-Saclay	Président
<b>Mme UGOLINI Sophie</b> DR INSERM Aix-Marseille Université	Rapporteur
<b>M. TARTOUR Eric</b> PU-PH Université Paris Descartes	Rapporteur
<b>Mme CAIGNARD Anne</b> DR INSERM Université Paris Diderot	Examineur
<b>Mme CREMER Isabelle</b> PU Université Pierre et Marie Curie	Examineur
<b>Mme ZITVOGEL Laurence</b> PU-PH Université Paris-Saclay	Directeur de thèse

*À mes grands-parents*

# REMERCIEMENTS

J'exprime ma profonde reconnaissance aux membres de mon jury de thèse pour avoir accepté d'évaluer ce travail de 3 ans. Je remercie le docteur Sophie Ugolini et le professeur Eric Tartour pour le temps qu'ils ont accordé à la relecture de ce manuscrit et pour leurs précieux conseils. Merci au professeur Isabelle Cremer et au docteur Anne Caignard d'avoir accepté la qualité d'examinatrice. Je remercie également le professeur Pierre Galanaud d'avoir accepté de présider ce jury.

Je remercie ma directrice de thèse, le professeur Laurence Zitvogel pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, d'une grande richesse scientifique et pour m'avoir proposé ce sujet porteur et original.

Je remercie le docteur Sylvie Rusakiewicz pour m'avoir formé à mon arrivée dans le laboratoire et m'avoir montré le potentiel du merveilleux monde des cellules NK (et du récepteur NKp30 !).

Mon cher Bertrand, dire que durant toutes ces années tu n'auras jamais réussi à prononcer mon nom de famille correctement ! Je te remercie sincèrement pour tous tes conseils, nos discussions animées et toutes ces soirées, et même tes sessions de chants (heureusement que tu n'as pas fait carrière dans le chant !). Je te souhaite le meilleur au pays des Caribous, avec ta famille en espérant que l'affaire sera ketchup ! Je compte sur toi pour atteindre l'objectif ultime de ton séjour au laboratoire et rentrer dans la légende du labo !

Un grand merci Meriem pour ta bonne humeur incessante, nos discussions scientifiques (ou non) et ton soutien constant. Le labo humain aurait été bien triste sans toi ! Merci pour ton aide précieuse sur le projet, tu étais une des rares personnes avec qui je pouvais parler NK ! Je te souhaite également bonne chance pour ce nouveau départ au Canada.

Mes remerciements à Mélodie, même si nos chemins ne se seront croisés que brièvement, ta bonne humeur communicative a égayé le labo humain ! Bon courage pour la suite de ton aventure à l'U1015 ou ailleurs.

Grazie Lisa, ton accent italien va me manquer. A qui vais-je apprendre les expressions françaises les plus « utiles » maintenant ?! Je te souhaite le meilleur pour la suite, tu vas y arriver !

Merci à Marine pour ton enthousiasme constant. Je te souhaite bon courage pour la suite !

Merci à Vichnou, pour tes conseils avisés et ta gentillesse. Je te souhaite le meilleur pour toi et ta famille.

Thank you Connie for our countless English talks, it was really a pleasure, and helped me a lot to improve my skills. Hope to see you in the Vegemite kingdom someday! I wish you the best for the future.

Un grand merci à toute l'équipe de l'U1015, Romain, Paula, Sonia, Fabien, Caroline, Nathalie, Claudine, Safae, Maryam, Gladys, Conrad, Bo, Anne-Gaëlle, Baptise, Séverine et Aurélie. Bon courage pour la suite de votre aventure à l'U1015.

Merci à l'équipe 2 de l'U1015, Sébastien, Alison (courage bientôt ton tour !), Romain et Mathilde, mes mesures d'ARN auraient été beaucoup moins passionnantes sans vous !

Un grand merci à Lisa B, pour toutes ces vidéos que tu m'as faites découvrir, nos discussions et ta bonne humeur. PGM FTW !

Merci à la fine équipe du LIO, Nathalie, Lydie, Mehdi, Jonathan et Marie, pour votre soutien et votre bonne humeur.

Merci à toutes les personnes avec qui j'ai collaboré de près ou de loin pendant cette thèse, Yann, Kariman, David, Gautier.

Merci également aux patients et aux donneurs de sang de l'EFS, sans vous rien n'aurait été possible.

Cher Dylan, merci pour ton soutien sans faille, ton amitié sincère et nos discussions téléphoniques. Je te souhaite le meilleur dans ton parcours universitaire, ne lâche rien et on se retrouve à l'îlet Gosier l'été prochain pour un pétépié !

Guillaume, merci pour tes conseils, nos longues conversations et ton amitié. Je te souhaite bon courage pour ta carrière déjà bien lancée. Et qui sait, peut-être qu'un jour j'aurai ma revanche sur ton Exorcist !

Merci Jean-David pour toutes nos discussions diverses et variés, tes conseils et ton soutien. Bientôt ton tour ! En espérant que ce soit avant que CoH3 ne soit là ! En tout cas bon courage pour cette dernière année.

Merci à la Roussibande, Camille, Antoine, Célia pour votre amitié de longue date (et c'est peu dire !)

Papa, Maman, Cédric, merci d'être à mes côtés, de m'avoir toujours encouragé et soutenu durant toutes mes études. C'est grâce à vous que Cédric et moi en sommes arrivés jusque-là. Vous pouvez en être fière.

Ma chère Cathy, merci pour ta douceur et ta générosité. Merci d'avoir toujours été là pour m'encourager et me soutenir.

Marion, merci d'avoir été là et de m'avoir soutenu. Cette thèse, tu y as grandement contribué. Merci pour tout.

Enfin, je ne remercierai jamais assez Euterpe, toi qui m'accompagne depuis (presque) toujours. Grâce à toi et à l'expression de ton art, j'ai pu traverser les moments les plus difficiles mais aussi connaître les moments les plus formidables.

# Table des matières

Abréviations.....	6
Introduction.....	11
I. Immunité et cancer .....	11
1. Caractéristiques des cellules tumorales .....	11
2. Le microenvironnement tumoral : à la jonction des interactions tumeur- hôte	14
3. Le concept d'immunosurveillance .....	15
4. Valeur pronostique de l'infiltrat immunitaire .....	17
5. La théorie de l' <i>immunoediting</i> .....	18
II. Les cellules <i>Natural Killer</i> dans le microenvironnement tumoral .....	24
1. Caractéristiques générales.....	24
2. Ontogénie des cellules NK .....	27
3. Les fonctions des cellules NK .....	32
4. La reconnaissance des cellules cibles et les récepteurs des cellules NK ...	38
5. Les cellules NK dans le microenvironnement tumoral .....	48
III. Les tumeurs stromales gastrointestinales (GIST) .....	53
1. Caractéristiques des GIST.....	53
2. Les traitements des GIST.....	56
3. Le rôle du système immunitaire dans le GIST.....	57
4. L'immunothérapie dans les GIST .....	59
Objectifs de thèse .....	62
Article 1: NKp30 isoforms and NKp30 ligands are predictive biomarkers of response to imatinib mesylate in metastatic GIST patients .....	64
Article 2: TNFR2/BIRC3-TRAF1 signaling pathway as a novel NK cell immune checkpoint in cancer .....	79

Discussion .....	125
Conclusion et perspectives.....	130
Bibliographie.....	133

# Abréviations

Ac: Anticorps	CLEC9A: <i>C-Type Lectin Domain Family 9 Member A</i>
ADCC: Cytotoxicité dépendante des anticorps	CLP: Progéniteur lymphoïde commun
AFIP: <i>Armed forces institute of pathology</i>	CMH: Complexe Majeur d'Histocompatibilité
AJCC: <i>Amercian Joint Commitee on Cancer</i>	CMP: Progéniteur myéloïde commun
ALK: <i>Anaplastic lymphoma kinase</i>	CSC: Cellules Souches Cancéreuses
AP1: <i>Activator protein 1</i>	Ct: Seuil de cycle
APC: Cellules présentatrices d'antigène	CTA: <i>Cancer testis antigen</i>
ARNm: ARN messager	CTL: Lymphocyte T cytotoxique
ATP: Adénosine triphosphate	CTLA-4: <i>Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4</i>
B2m: Bêta2 microglobuline	DAP10/12: <i>DNAX-activation protein 10/12</i>
B7-H6: <i>B7 homolog 6</i>	DBA: Diméthylbenzothracène
BAG6: <i>BCL2-associated athanogene 6</i>	DC: Cellules dendritique
BIRC2/3: <i>Baculoviral IAP Repeat Containing 2/3</i>	DEX: Exosome dérivé des cellules dendritiques
CAR: <i>Chimeric antigen receptor</i>	DNAM-1: <i>DNAX accessory molecule-1</i>
CBNPC: Cancer Bronchique Non à Petites Cellules	EBV: Virus d'Epstein-Barr
cFLIP: <i>cellular FLICE-like inhibitory protein</i>	EGFR: <i>Epidermal growth factor receptor</i>
ciAP1/2: <i>cellular inhibitor of apoptosis protein-1/2</i>	EpCAM: <i>Epithelial cell adhesion molecule</i>
CIS: <i>Cytokine-induced SH2 domain-containing protein</i>	FADD: <i>Fas-associated death domain</i>
	FasL: <i>Fas-ligand</i>



Fc: Fragment constant	IgG: Immunoglobuline G
FGF: <i>Fibroblast growth factor</i>	IKK: <i>Inhibitor of I kappa B kinase</i>
Flt3-L: <i>Fibromyalgia syndrome-like tyrosine kinase-3 ligand</i>	IL-1: Interleukine-1
GAS: <i>Interferon-gamma-activated site</i>	IL-10: Interleukine-10
GIST: Tumeurs stromales gastrointestinales	IL-12: Interleukine-12
GM-CSF: <i>Granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor</i>	IL-12R: <i>Interleukin-12 receptor</i>
GPI: Glycosylphosphatidylinositol	IL-15: Interleukine-15
HA: Hémagglutinine	IL-15Rα: <i>Interleukin-15 receptor subunit alpha</i>
HCMV: Cytomégalovirus humain	IL-17: Interleukine-17
HDACi: Inhibiteur des histones désacétylsases	IL-18: Interleukine-18
HER2: <i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>	IL-2: Interleukine-2
HLA: <i>Human Leukocyte Antigen</i>	IL-21: Interleukine-21
HPC: Cellule précurseur hématopoïétique	IL-3: Interleukine-3
HPV: Papillomavirus humain	IL-33: Interleukine-33
HSC: Cellule souche hématopoïétique	IL-7: Interleukine-7
HSP70: <i>Heat shock protein 70</i>	IL-7Rα: <i>Interleukin-7 receptor subunit alpha</i>
ICAM-1: <i>Intercellular adhesion molecule-1</i>	IL-8: Interleukine-8
IDO: Indoleamine 2,3-dioxygénase	ILC: Cellule lymphoïde innée
IFNGR: <i>Interferon gamma receptor</i>	IM: Imatinib mesylate
IFNγ: Interféron gamma	INCa: Institut National Du Cancer
	IS: Synapse immunologique

ITAM: *Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*

ITIM: *Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*

IUCC: Union internationale pour le contrôle du cancer

JAK: Janus tyrosine kinase

JNK: *c-Jun N-terminal kinase*

KIR: *Killer-cell immunoglobulin-like receptor*

LAG3: *Lymphocyte activation gene 3*

LAGE-1: *L Antigen Family Member 1*

LAMP-1: *Lysosomal-associated membrane protein 1*

LB: Lymphocyte B

LDH: Lactate déshydrogénase

LFA-1: *Lymphocyte function-associated antigen 1*

LFA-1: *Lymphocyte function-associated antigen 1*

LT: Lymphocyte T

MAGE-A1: *Melanoma-associated antigen 1*

MALT: Tissu lymphoïde associé aux muqueuses

MAP: *Mitogen-activated protein*

MART: *Melanoma antigen recognized by T cells*

MCA: Méthylcholanthrène

MCMV: Cytomégalovirus murin

MDSC: Cellules myéloïdes suppressives

MEKK: MAP kinase kinase kinase

MICA/B: *MHC class I polypeptide-related sequence A/B*

MIP-1 $\alpha$ : *Macrophage inflammatory protein-1alpha*

MKK: *Mitogen-activated protein kinase kinase*

MM: Mélanome Métastatique

NA: Neuraminidase

NCAM: *Neural cell adhesion molecule*

NCR: *Natural cytotoxicity receptor*

NEMO: *NF-kappa-B essential modulator*

NF- $\kappa$ B: *Nuclear factor  $\kappa$ B*

NIH: National institutes of health

NIK: *NF- $\kappa$ B inducing kinase*

NK: *Natural Killer*

NKGD2: *Natural-killer group 2, member D*

NKT: *Natural Killer T cell*

OLS: Organe Lymphoïde Secondaire

PCNA: *Proliferating cell nuclear antigen*

PD-1: *Programmed cell death-1*

PDGFRA: *Platelet-derived growth factor receptor alpha*

PD-L1: *Programmed Death-Ligand 1*

PGE2: *Prostaglandine E2*

PSA: *Prostate specific antigen*

PTK: *Protéines Tyrosine Kinase*

PVR: *Récepteur au poliovirus*

qPCR: *quantitative polymerase chain reaction*

RAE-1: *Retinoic acid early transcript 1*

RAG: *Recombinase activating Gene*

RANTES: *Regulated upon activation, normally T-expressed, and secreted*

RING: *Really interesting new gene*

RIP: *Receptor interacting protein*

ROS: *Dérivés réactifs de l'oxygène*

SAGE1: *Sarcoma antigen 1*

SCF: *Stem cell factor*

SI: *Système immunitaire*

siARN: *Petit ARN interférant*

SOCS2: *Suppressor-of-cytokine-signaling 2*

STAT1: *Signal transducer and activator of transcription 1*

TAA: *Antigène associé aux tumeurs*

TACE: *Tumor necrosis factor alpha converting enzyme*

TAM: *Macrophage associés à la tumeur*

TGFβ: *Transforming Growth Factor bêta*

Th1: *T cell helper type 1*

Th17: *T cell helper type 17*

Th2: *T cell helper type 2*

TIGIT: *Human T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains*

TILs: *Lymphocytes infiltrant la tumeur*

TIM3: *T-cel immunoglobulin mucin 3*

TNFR1/2: *Tumor necrosis factor receptor 1/2*

TNFα: *Tumor necrosis factor alpha*

TRADD: *Tumor necrosis factor receptor associated death domain*

TRAF1/2: *Tumor necrosis factor 1/2*

TRAIL-R: *Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand receptor*

Treg: *Lymphocyte T régulateurs*

ULBP1/6: *UL16-binding proteins 1/6*

VCAM-1: *Vascular cell adhesion molecule-1*

VEGF: *Vascular endothelial growth factor*

VIH: Virus de l'Immunodéficience Humaine

VS: Volontaire Sain

WT: *Wild type*

ZAP70: *Zeta chain of T-cell receptor associated protein kinase 70*

# Introduction

## I. Immunité et cancer

Le mal du siècle. Ainsi a-t-on nommé le cancer en ce début de XXIème siècle ; le cancer apparaît en effet comme un risque majeur de santé publique au niveau mondial avec 384 442 cas de cancers diagnostiqués en France en 2015 et 149 456 décès (INCa 2016). Le cancer ne touche pas uniquement la santé physique du patient : 8,5% des personnes interrogées dans le cadre de l'étude VICAN 2 (« La vie deux ans après un diagnostic de cancer ») ont ressenti une discrimination ou un rejet dans leur entourage. De plus la situation professionnelle des malades se dégrade, le taux d'emplois passant de 82% au diagnostic à 61.3% deux ans après (INCa 2016). Le cancer apparaît donc comme un domaine de recherche primordial et malgré les avancées majeures réalisées ces dernières années, de nombreux mécanismes des cellules tumorales sont encore incompris.

La recherche sur le cancer s'est récemment orientée vers le concept de médecine personnalisée où le traitement est adapté suivant les caractéristiques uniques du patient et de la tumeur dont il est atteint. Ainsi, pour cela, il apparaît primordial de caractériser précisément le mécanisme de chaque cancer mais également de prendre en compte la diversité interindividuelle des tumeurs. Alors que depuis le début de l'oncologie les cellules cancéreuses étaient la cible directe des traitements, le renouveau de la cancérologie est apparu ces dernières années avec les immunothérapies anticancéreuses où l'on cherche à cibler le système immunitaire (SI) pour induire son activation contre les tumeurs. La compréhension des mécanismes de l'immunité antitumorale est devenue indispensable.

### 1. Caractéristiques des cellules tumorales

Le cancer est un processus en plusieurs étapes initialement généré par une accumulation de mutations génétiques conduisant à la perte de contrôle du mécanisme de prolifération d'une cellule normale. Le processus conduisant à la formation d'une tumeur dépend de plusieurs facteurs, environnementaux et génétiques, ces facteurs variant suivant le type de cancer. La tumeur nouvellement formée peut rester au sein du tissu sain dans lequel elle s'est développée (tumeur primaire) ou envahir des tissus voisins et se disséminer

dans l'organisme via le système sanguin ou lymphatique (métastases). Dans le but d'incorporer les différents facteurs conduisant à la formation d'une tumeur, Hanahan et collègues ont proposé au début des années 2000 une définition qui décrit les caractéristiques communes aux cellules cancéreuses (Hanahan and Weinberg 2000) :

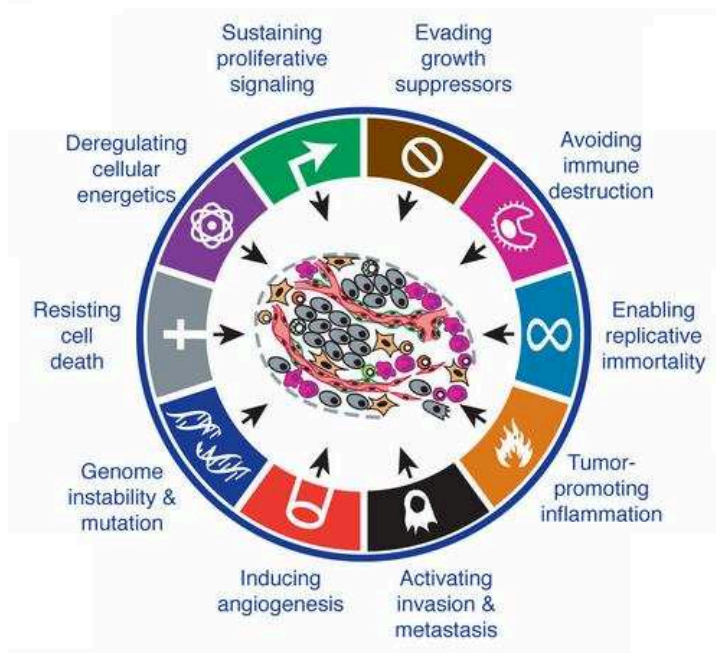
- Echappement à l'apoptose : inhibition des gènes responsables du déclenchement de la mort programmée
- Indépendance vis-à-vis des signaux de croissance : la cellule tumorale produit ses propres facteurs de croissance ou active de manière constitutive des gènes de prolifération
- Insensibilité aux signaux inhibant la croissance : mutation des gènes des boucles de rétrocontrôle régulant la croissance cellulaire
- Invasion des tissus et métastases : dissémination dans les tissus voisins et dans l'organisme de cellules tumorales via le mécanisme de transition épithélio-mésenchymateuse : le passage d'une organisation tissulaire en épithélium stratifié, incompatible avec la migration cellulaire, à une organisation mésenchymateuse permettant la formation de métastases
- Potentiel réplicatif illimité : perte des points de contrôle de la division cellulaire
- Angiogenèse continue : la cellule tumorale produit des facteurs de croissance angiogéniques (*Vascular endothelial growth factor* (VEGF), *Fibroblast growth factor* (FGF)) induisant la croissance de vaisseaux sanguins autour de la tumeur

Cependant les connaissances sur les mécanismes du cancer ont progressé depuis les années 2000 et Hanahan et collègues ont ainsi mis à jour la liste des caractéristiques partagées par les tumeurs en ajoutant les 4 points suivants (Hanahan and Weinberg 2011) (**Figure 1**) :

- Dérégulation du métabolisme énergétique de la cellule : modification, reprogrammation des mécanismes du métabolisme énergétique
- Echappement au système immunitaire : la tumeur se soustrait à la surveillance du système immunitaire en diminuant l'expression de ligands

activateurs des cellules immunitaires et/ou en exprimant des molécules inhibitrices

- Instabilité génomique et mutation : accumulation de mutations génétiques dans le génome conférant un avantage sélectif à la cellule tumorale
- Environnement inflammatoire pro-tumoral : l'inflammation chronique entretient un environnement pro-tumoral



**Figure 1:** Les caractéristiques des cellules tumorales énumérées par Hanahan et collègues. 10 capacités des cellules cancéreuses ont été décrites : l'évasion au inhibiteurs de croissance, l'échappement immunitaire, potentiel répliquatif illimité, inflammation pro-tumorale, évation des tissus et métastases, induction de l'angiogenèse, instabilité génomique et mutations, résistance à la mort cellulaire, dérégulation du métabolisme énergétique et signaux de prolifération continu. D'après Hanahan and Weinberg 2011.

On peut regrouper ces caractéristiques de la cellule tumorale en deux composantes principales. La première composante est celle qui confère un phénotype prolifératif à la cellule : dérégulation de la division cellulaire, perte de l'apoptose, indépendance des facteurs de croissance. La deuxième composante tend à créer un microenvironnement particulier, essentiel pour le développement tumoral : angiogenèse, échappement au système immunitaire, environnement inflammatoire. C'est cette deuxième composante qui est fondamentale pour comprendre l'interaction entre l'hôte et la tumeur.

## 2. Le microenvironnement tumoral : à la jonction des interactions tumeur-hôte

La compréhension de la complexité des tumeurs a révolutionné la cancérologie dans les dix dernières années. On comprend désormais que l'environnement tumoral possède une architecture complexe, comparable à celle d'un organe de l'hôte. La compréhension de la tumeur implique d'étudier les différents types cellulaires présents dans le microenvironnement qui se forme au cours de la tumorigenèse. Celui-ci est composé d'une matrice extracellulaire, de facteurs solubles et de cellules non-néoplasiques comme des cellules endothéliales vasculaires ou des cellules immunitaires. Sa composition varie suivant les patients et l'évolution de la maladie (Allen and Jones 2011). A la diversité cellulaire de l'hôte s'ajoute une diversité des cellules cancéreuses elles-mêmes, sur le plan génétique mais aussi phénotypique. En effet, de nombreuses études ont permis de mettre en évidence une sous-population particulière de cellules appelées cellules souches cancéreuses (CSC). Ces cellules, comme les cellules souches saines, sont capables de s'auto-renouveler et d'induire la formation d'une nouvelle tumeur lorsqu'elles sont greffées dans un nouvel individu (Clarke et al. 2006; Nguyen et al. 2012).

Le microenvironnement tumoral possède aussi des conditions physico-chimiques différentes du tissu sain, comme de l'hypoxie, une acidité plus élevée et un faible taux de glucose. Cet environnement difficile exerce une pression de sélection entraînant la survie des cellules ayant acquis des mutations spécifiques permettant leur prolifération. De plus, les cellules saines environnantes répondent également aux différentes molécules présentes dans ce microenvironnement. Ainsi le tissu entourant la tumeur, ou stroma, joue un rôle important. Les interactions hôte-tumeur passent indirectement par la matrice extracellulaire via les différentes molécules sécrétées par les cellules présentes à cette interface (Tlsty and Coussens 2006).

Les cellules immunitaires sont présentes à cette interface, directement en contact avec le stroma. Les premières observations de cet infiltrat immunitaire dans les tumeurs ont été rapportées dès le XIX<sup>ème</sup> siècle par Virchow en 1863, il théorise alors que le cancer est dû à une inflammation chronique (Balkwill, Charles, and Mantovani 2005). Près de 50 ans plus tard, Ehrlich sera le premier à introduire le concept d'immunosurveillance (Ehrlich 1909).



### 3. Le concept d'immunosurveillance

Le premier lien entre cancer et système immunitaire a été établi par William Coley, qui en 1910 a décrit comment certains patients opérés pour leur sarcome développent une érysipèle (une infection de la peau par des bactéries du genre *Streptococcus*) et obtiennent des rémissions complètes de leur cancer (Coley 1910). Il a émis ainsi l'hypothèse que la progression tumorale est contrôlée par la réaction inflammatoire secondaire à l'infection. Ce postulat le conduit à développer le premier médicament basé sur l'immunothérapie : la toxine de Coley : une solution de bactérie mortes (*Streptococcus pyogenes* et *Serratia marcescens*) activant le système immunitaire et qui induit secondairement une réponse anti-tumorale.

En parallèle, Paul Ehrlich a conceptualisé la notion d'immunosurveillance en affirmant que le système immunitaire serait continuellement en alerte contre les cellules transformées (Ehrlich 1909). Mais ce n'est que cinquante ans plus tard, que Burnet introduit la notion de néo-antigènes tumoraux responsables selon lui d'une réaction immunitaire entraînant l'élimination des cancers se développant (Burnet 1957, 1964). Cette théorie est contestée par Stutman en 1974 et 1979 d'après ses expériences sur un modèle d'immunodéficience. En effet, chez des souris athymiques, donc dépourvues de système immunitaire adaptatif, il n'observe pas d'augmentation de la fréquence de tumeurs spontanées ou induites (Stutman 1974, 1979).

Il faut attendre le début des années 2000 pour que la théorie de l'immunosurveillance soit validée. Les travaux de van den Broek, Smyth et Street sur des modèles murins déficients pour les gènes codant la perforine (une glycoprotéine cytotoxique créant des pores) (van den Broek et al. 1996; Smyth et al. 2000; Street, Cretney, and Smyth 2001) et ceux de Shankaran sur des souris déficientes pour des protéines de la voie de l'interféron  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) (Shankaran et al. 2001) apportent la preuve de la validité de la théorie de l'immunosurveillance. Sans ces molécules clés du système immunitaire, la susceptibilité des souris à développer des tumeurs spontanées ou induites par des carcinogènes comme le Méthylcholanthrène (MCA) ou le Diméthylbenzothracène (DBA) est augmentée. De plus, les souris déficientes pour les *Recombinase activating Gene 1* et 2 (RAG), gènes indispensables à

la génération de lymphocytes B (LB) et lymphocytes T (LT) matures, sont elles aussi plus susceptibles de développer des tumeurs spontanées ou induites (Shankaran et al. 2001).

La déficience en cellules de l'immunité innée a également un impact sur l'immunosurveillance. En effet, des souris déplétées en cellules *Natural Killer* (NK) et *Natural Killer T* (NKT) sont plus sujettes à développer des tumeurs induites par rapport à des souris contrôles (Smyth 2001). Gao et collègues ont montré également que les lymphocytes  $\gamma\delta$  jouent un rôle dans l'élimination des tumeurs cutanées via leur capacité à sécréter une grande quantité d'IFN $\gamma$  (Gao et al. 2003).

Des observations chez l'Homme démontrent également le rôle du système immunitaire dans la prévention de la formation des tumeurs. Les personnes atteintes de déficits primaires de l'immunité présentent une incidence plus élevée de cancers. Une augmentation de l'incidence des tumeurs épithéliales de l'estomac, du sein et du rein a été observée chez des personnes atteintes d'un déficit de l'immunité humorale (Kinlen 1985; van der Meer et al. 1993; Salavoura et al. 2008). Les patients atteints de trisomie présentent une prévalence 20 fois supérieure à la population générale au développement des leucémies, ces personnes présentant un déficit fonctionnel des LT (Xavier and Taub 2010). Il a également été observé que les patients atteints du syndrome de Chediak Higashi, une maladie caractérisée par une déficience des fonctions cytotoxiques des lymphocytes NK, ont 200 fois plus de risque de développer un cancer (Kobayashi 1985).

Les personnes infectées par le virus de l'immunodéficience acquise de type 1 (VIH-1) sont plus susceptibles de développer des cancers (Boshoff and Weiss 2002). Ces cancers chez les patients séropositifs sont souvent associés à des infections par d'autres virus comme celui d'Epstein-Barr (EBV, lymphomes), l'Herpès (sarcome de Kaposi), les papillomavirus humains (HPV, cancer urogénitaux), l'Hépatite B et C (cancer du foie). L'immunodéficience serait donc un facteur de risque pour l'apparition de cancers. Guiguet et collègues démontrent cette relation en corrélant négativement le nombre absolu de LT CD4<sup>+</sup> et l'incidence des cancers (Guiguet et al. 2009). De plus, l'utilisation de médicaments immunosuppresseurs utilisés pour la prévenir le rejet du greffon, notamment dans le cadre de transplantations d'organes, augmente le risque de développer un cancer. Une incidence plus élevée de lymphomes a été notamment observée chez les transplantés rénaux (Hoover and Fraumeni 1973), ainsi qu'un risque 2 à 5 fois plus important de développer un cancer du

côlon, du larynx, du poumon, du rein ainsi que de la prostate (Birkeland et al. 1995). Il a été aussi observé que l'arrêt des immunosuppresseurs pouvait entraîner des rémissions spontanées (Rizzi et al. 2009).

#### 4. Valeur pronostique de l'infiltrat immunitaire

Malgré les premières observations d'infiltrat immunitaire par Virchow en 1863, ce n'est que durant les années 1990 que le lien entre le pronostic clinique et l'infiltrat immunitaire a été démontré avec la découverte de l'association entre la survie de patients atteints de mélanome et le nombre de lymphocytes infiltrant la tumeur (TILs) (Clark et al. 1989; Clemente et al. 1996). Depuis, plusieurs antigènes tumoraux spécifiques du mélanome ont été identifiés, ainsi que des LT spécifiques de ces antigènes (van der Bruggen et al. 1991; Scanlan, Simpson, and Old 2004). De nombreuses études ont par la suite démontré que l'infiltrat immunitaire avait également une valeur pronostique dans le cancer du côlon et dans celui de l'ovaire (Galon et al. 2006; L. Zhang et al. 2003).

L'efficacité de l'infiltration lymphocytaire dans les cancers varie selon le type de cellule immunitaire et la tumeur. Les LT CD8<sup>+</sup> sont primordiaux dans le cancer du côlon, du poumon et du sein où leur infiltrat est corrélé à une meilleure survie (Kawai et al. 2008; Mahmoud et al. 2011; Naito et al. 1998) ; les LT CD4<sup>+</sup> *helper* Type 1 (Th1) dans le cancer colorectal, le cancer hépatique et celui du sein (Budhu et al. 2006; Galon et al. 2006; Kristensen et al. 2012) ; les cellules NK dans les tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST), le cancer colorectal et le cancer du poumon (Coca et al. 1997; Rusakiewicz, Semeraro, et al. 2013; Villegas et al. 2002).

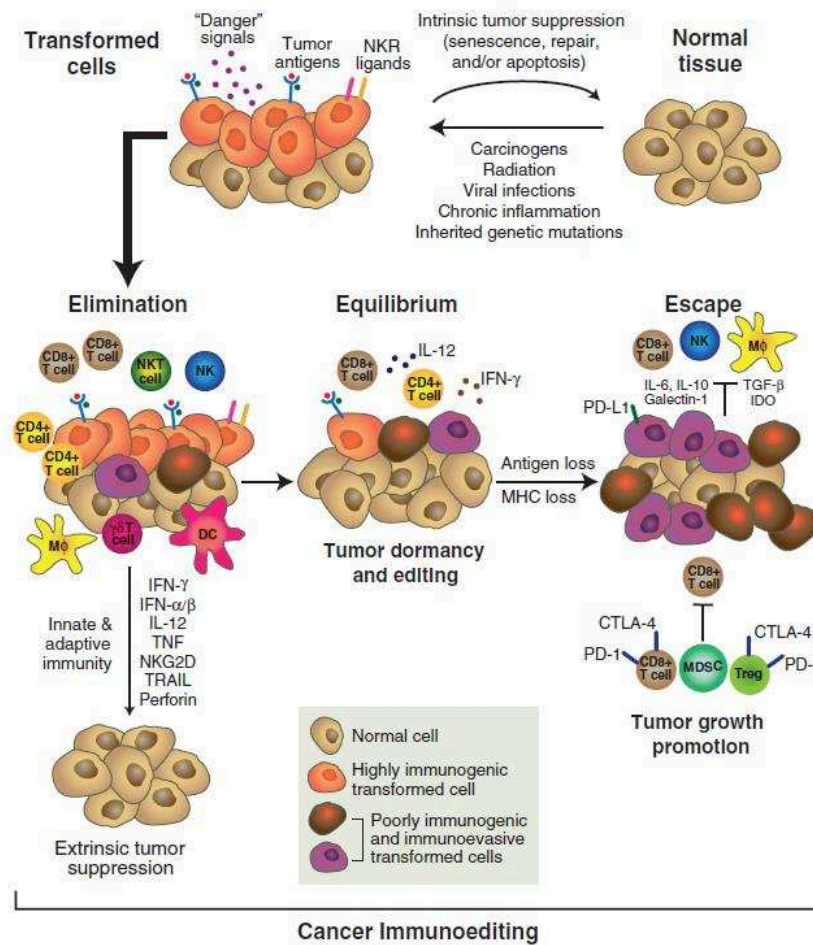
Les macrophages peuvent aussi infiltrer les tumeurs, ils sont alors dénommés macrophages associés à la tumeur (TAM). On distingue 2 types distincts de macrophages en fonction de leur phénotype : les macrophages M1 ou M2 (exprimant respectivement CD64 et CD163). Suivant le microenvironnement tumoral, ils adoptent soit un phénotype pro-inflammatoire M1 associé à une survie prolongée dans les cancer de la prostate, des bronches et du côlon (Forssell et al. 2007; Kim et al. 2008; Shimura et al. 2000), soit immunosuppresseur M2, généralement considérés pro-tumoraux (Joyce and Pollard 2009). Les lymphocytes T régulateurs (Treg), des LT CD4<sup>+</sup> exprimant le CD25, le récepteur à forte affinité pour l'IL-2 et le facteur de transcription Foxp3 jouant un rôle dans le maintien de la

tolérance, ils ont également été associés à un mauvais pronostic clinique, notamment dans le cancer de l'ovaire, dans le mélanome et dans le cancer du sein (Curiel et al. 2004; Gobert et al. 2009; Mougiakakos et al. 2010). Au contraire, les Treg ont une valeur pronostique positive dans le cancer colorectal (Whiteside 2014). Cela peut s'expliquer par la forte inflammation pro-tumorale qui caractérise le microenvironnement des cancers colorectaux, les Treg ayant un rôle protecteur en inhibant les cellules inflammatoires.

Toutes ces études établissent l'importance du système immunitaire dans la reconnaissance et l'élimination des tumeurs. Cependant, comment expliquer la survenue des cancers chez des individus immunocompétents malgré cette immunosurveillance ? La réponse à cette question se trouve dans la théorie de l'Evolution de Darwin : l'immunosurveillance entrainerait une pression de sélection engendrant l'émergence des clones tumoraux capables de résister ou d'échapper au système immunitaire. C'est *l'immunoediting* (Dunn et al. 2002).

## 5. La théorie de *l'immunoediting*

En 2011 Schreiber et collègues montrent que la greffe de tumeurs provenant d'animaux immunocompétents chez d'autres animaux immunoincompétents entraîne la formation de tumeurs. Ils confirment ainsi la validité de cette théorie (Schreiber, Old, and Smyth 2011). Ce modèle sépare en 3 phases la formation d'une tumeur et son interaction avec le système immunitaire : la phase d'Elimination, la phase d'Equilibre et la phase d'Echappement (**Figure 2**).



**Figure 2:** Les 3 phases de la théorie de l'immunoediting: l'Elimination, les cellules cancéreuses sont éliminées rapidement par le système immunitaire; l'Equilibre, les cellules immunitaires éliminent les cellules tumorales à une vitesse également que les cellules tumorales se répliquent, c'est durant cette étape que les cellules tumorales vont développer une résistance via la pression de sélection exercée par le système immunitaire; l'Echappement, les cellules tumorales sont devenues résistantes aux cellules du système immunitaire, permettant leur croissance. D'après Schreiber et al. 2011.

### A. La phase d'Elimination

Durant cette phase, les cellules du système immunitaire reconnaissent et éliminent les cellules tumorales avant qu'elles ne soient cliniquement détectables. Il s'agit du concept précédemment décrit de l'immunosurveillance. Le mécanisme de détection des cellules tumorales par le système immunitaire est basé sur l'expression d'antigènes tumoraux ou de molécules de stress comme *MHC class I polypeptide-related sequence A* et B (MICA/B). Les antigènes tumoraux sont reconnus par les cellules du système immunitaire adaptatif. Plus d'une centaine d'antigènes associés aux tumeurs (TAA) ont été caractérisés chez l'Homme depuis que van der Bruggen et collègues ont identifié *Melanoma-associated antigen 1*

(MAGE-A1), le premier TAA dans le mélanome (van der Bruggen et al. 1991). Ils ont été classés en 5 familles :

- Les néo-antigènes spécifiques des tumeurs, souvent issus de mutations dans des gènes de voies de prolifération (*Anaplastic lymphoma kinase* (ALK), *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog* (KRAS), p53, ...). Leur haute spécificité pour les tumeurs permet de cibler efficacement les cellules transformées avec une faible toxicité.
- Les antigènes issus de virus oncogéniques.
- Les antigènes dont l'expression est partagée par les cellules tumorales et le tissu sain mais avec une conformation modifiée permettant une reconnaissance par le système immunitaire (*Epithelial cell adhesion molecule* (EpCAM)).
- Les antigènes de différenciation exprimés préférentiellement par la tumeur (*Melanoma antigen recognized by T cells* (MART), *Prostate specific antigen* (PSA), ...).
- Les antigènes spécifiques d'origine germinale comme MAGE-A1, *L Antigen Family Member 1* (LAGE-1), *Sarcoma antigen 1* (SAGE1), ... Le risque de destruction des cellules germinales par les cellules du système immunitaire adaptatif est faible car elles n'expriment pas les molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) (Hotta et al. 2000).

Les cellules du système immunitaire inné reconnaissent les tumeurs indépendamment de l'expression des TAA et sont notamment activées par l'expression de molécules de stress. En effet les cellules NK reconnaissent l'expression de MIC A/B à la surface des cellules tumorales ou bien l'absence de CMH I (Bryceson and Ljunggren 2008; Pende et al. 2002). De plus, les débris des cellules tumorales lysées par les NK établissent le lien avec le système adaptatif en étant pris en charge par les Cellules Présentatrices d'Antigène (APC) qui vont présenter sur leur CMH II les peptides d'origine tumorale et activer ainsi les lymphocytes T.

## B. La phase d'Equilibre

Dans des conditions optimales, la tumeur active le système immunitaire via l'expression de TAA ou de molécules de stress entraînant l'activation du système

immunitaire inné et adaptatif. Cette activation est renforcée par la sécrétion par les cellules du système adaptatif de cytokines immunostimulantes comme l'IFN $\gamma$  conduisant ainsi à l'élimination de la tumeur. Cependant les cellules tumorales peuvent également produire des cytokines immunosuppressives (Interleukine-10 (IL-10), *Transforming Growth Factor*  $\beta$  (TGF $\beta$ ), ...) et ainsi diminuer l'efficacité des cellules immunitaires conduisant à la survie de quelques cellules tumorales, possiblement les cellules souches cancéreuses, qui restent néanmoins sous contrôle du système immunitaire : c'est la phase d'Equilibre.

Différentes études ont démontré l'existence de cette phase, notamment Koebel et collègues qui ont observé que des souris traitées par de faibles doses de MCA présentaient des cellules tumorales mais ne développaient pas de tumeurs apparentes. Cependant lorsque les lymphocytes T et l'IFN $\gamma$  sont déplétés, des tumeurs se développent rapidement aux sites d'injection de MCA (Koebel et al. 2007). Chez l'Homme, il a été observé des cas de mélanomes étant apparus à la suite de transplantation d'organe provenant d'un donneur en rémission (Elder, Hersey, and Branley 1997). Ces différents rapports montrent l'importance du système immunitaire dans la prévention de la tumeur, mettant également en évidence la pression qu'exerce le SI sur les cellules tumorales. Cette pression de sélection engendre la survie des cellules cancéreuses capables de se soustraire au système immunitaire grâce à l'accumulation de mutations qui induisent une diminution de l'expression de molécules permettant leur reconnaissance par le SI (TAA, CMH I, ...) ou bien une augmentation de celles inhibant les cellules immunitaires (*Programmed Death-Ligand 1* (PD-L1), *Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4* (CTLA-4)) (Fridman et al. 2014). Ceci conduit à la dernière phase : l'Échappement.

### C. La phase d'Échappement

L'échappement tumoral au SI est le résultat de la pression de sélection exercée par les cellules du système immunitaire. Les cellules tumorales rentrent alors dans une phase de croissance et de dissémination conduisant au diagnostic clinique du cancer. Cette phase voit aussi l'augmentation de la proportion de cellules pro-tumorales comme les Treg et les cellules myéloïdes suppressives (MDSC) (Ostrand-Rosenberg and Sinha 2009; Zou 2006). Différentes populations cellulaires sont présentes dans le microenvironnement tumoral et durant la phase d'Échappement, la tumeur développe différents mécanismes pour se soustraire à leur surveillance ou bien bénéficier du rôle pro-tumoral de certaines cellules :

- **Les macrophages** représentent une part importante de l'infiltrat immunitaire. Comme mentionné précédemment, ils peuvent se différencier soit en M1 soit en M2. Les M1 participent à l'élimination des tumeurs en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-12 activant les LT. Les M2 au contraire sécrètent des cytokines immunosuppressives favorisant la croissance des cellules tumorales et l'angiogenèse comme l'IL-10, le TGF $\beta$  et le VEGF (Mantovani et al. 2006; Noy and Pollard 2014).
- **Les cellules myéloïdes suppressives (MDSC)** sont des cellules immatures du SI inné aux capacités immunosuppressives très importantes. Elles sont générées à l'issue de l'inflammation chronique du microenvironnement tumoral (Bunt et al. 2006). Elles produisent de l'arginase et des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) dans la matrice extracellulaire, bloquant ainsi les réponses immunitaires, et augmentent la population de Treg (Marvel and Gabrilovich 2015).
- **Les lymphocytes Treg** sont très présents dans les tumeurs (Ondondo et al. 2013). Comme les macrophages M2, ils produisent des cytokines immunosuppressives (IL-10, TGF $\beta$ ) (Bauer et al. 2014) et leur présence est corrélée à une progression des tumeurs (Mougiakakos et al. 2010). La tumeur ou les cellules immunitaires peuvent produire de l'Indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO), une molécule immunosuppressive induisant notamment la conversion des LT naïfs en lymphocytes Treg par la dégradation du tryptophane (Munn and Mellor 2006).
- **Les lymphocytes Th1** sont dans la majorité des cancers de bon pronostic. Ils sont capables d'augmenter les fonctions cytotoxiques des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) qui éliminent les cellules malignes et produisent de grande quantité d'IFN $\gamma$  (Pagès et al. 2010). Cependant l'IFN $\gamma$  peut avoir un rôle délétère car il permet l'expression de PD-L1 (Sharpe et al. 2007). Ainsi, les cellules tumorales peuvent exprimer le ligand inhibiteur PD-L1 mais aussi diminuer leur expression du CMH I tout en induisant l'expression du récepteur inhibiteur CTLA-4 sur les LT permettant ainsi aux cellules tumorales d'échapper à leur surveillance (Dong et al. 2002). Les lymphocytes Th2, en revanche, ont un rôle pro-tumoral via la production de cytokines Th2 (IL-5, IL-4 et IL-13) qui induisent la polarisation des macrophages de type M2 (DeNardo et al. 2009). Les tumeurs du sein et du pancréas sont fortement infiltrées par des lymphocytes Th2 (Aspord et al. 2007;



De Monte et al. 2011). Les lymphocytes Th17 présentent un rôle très fluctuant suivant le contexte. Leur action dans l'immunité du cancer est ambiguë : leur infiltration dans les cancers du foie, du colon et du pancréas a été corrélée avec un mauvais pronostic clinique (He et al. 2011; Tosolini et al. 2011; Zhang et al. 2009) alors que la survie des patientes atteintes de cancer de l'ovaire est corrélée à un fort taux de Th17 (Kryczek, Banerjee, et al. 2009). De la même manière, chez des souris déficientes en IL-17 (la cytokine majeure produite par les LT Th17), la croissance tumorale de la lignée tumorale MC38 est accélérée alors que celle des lignées B16 et MB49 est réduite chez ces mêmes souris (Kryczek, Wei, et al. 2009; Wang et al. 2009). De même, des lignées de carcinome cervical humain sécrétant de l'IL-17 après transfection croissent plus rapidement dans des souris « nude » que les lignées contrôles (Tartour et al. 1999). Cependant lorsque des tumeurs murines hématopoïétiques transfectées avec le gène murin de l'IL-17 sont greffées dans des souris immunocompétentes, leur croissance est diminuée par rapport aux tumeurs contrôles. Cela est dû au fait que l'IL-17 promeut la différenciation de LT cytotoxiques contre la tumeur (Benchetrit et al. 2002).

- **Les lymphocytes B** : leur rôle dans le microenvironnement tumoral est ambigu : ils peuvent être pro-tumoraux de par leur participation à la mise en place de l'inflammation chronique et leur promotion de la croissance tumorale en adoptant un profil immunosuppresseur (Schioppa et al. 2011). Cependant ils peuvent également avoir un rôle anti-tumoral en étant capables de supporter les LT en produisant des anticorps (Ac), des cytokines immunostimulatrices et activer les LT en tant que APC (Harris et al. 2000).
- **Les cellules NK** sont à la frontière du système immunitaire inné et du système adaptatif. De nombreuses études ont démontré leur rôle dans l'élimination des métastases et des petites tumeurs (Guillerey and Smyth 2016). Pour se dérober à la surveillance des lymphocytes NK, les cellules tumorales peuvent augmenter l'expression des molécules HLA-G et HLA-E (L. Derre et al. 2006; Tripathi and Agrawal 2006) qui inhibent les cellules NK. De plus la tumeur peut également sécréter des ligands solubles du récepteur activateur des cellules NK *natural-killer group 2, member D* (NKG2D) afin d'entraîner une internalisation de ce récepteur

(Groh et al. 2002a). Le rôle des cellules NK dans l'environnement tumoral sera détaillé dans le chapitre suivant.

Une autre théorie s'oppose à celle de l'*immunoediting*, il s'agit de la théorie de la tolérance, développée par Willimsky et Blankenstein. Celle-ci théorise que les cellules tumorales n'échappent pas au système immunitaire mais sont reconnues par celui-ci et induisent une tolérance. Willimsky et collègue ont démontré que dans un modèle de cancer murin basé sur l'activation spontanée de l'oncogène SV40, une réponse immunitaire initiale est détectée mais qu'une tolérance est mise en place secondairement. Néanmoins, lorsque ces cellules tumorales sont greffées dans des souris sans tumeur, elles déclenchent une réponse immunitaire (Willimsky and Blankenstein 2005). En réalité, il est tout à fait probable que cette théorie soit un des mécanismes de l'*immunoediting*, la tolérance étant une forme d'échappement pour la tumeur. Celle-ci, comme énoncé plus haut, va sécréter lors de la phase d'échappement différentes cytokines comme le TGF $\beta$ , le VEGF ou l'IL-10 induisant un environnement immunosuppresseur et attirant différentes cellules (Treg, MDSC,...) qui participent à la mise en place d'une tolérance de la tumeur par le SI.

Grâce à leur rôle charnière, les cellules NK représentent une population cellulaire d'un grand intérêt. Leur capacité à lyser des cellules tumorales sans activation par un antigène spécifique en font une cible privilégiée pour l'immunothérapie antitumorale. Dans la partie suivante, nous allons donc nous intéresser aux cellules NK dans le contexte de la tumeur.

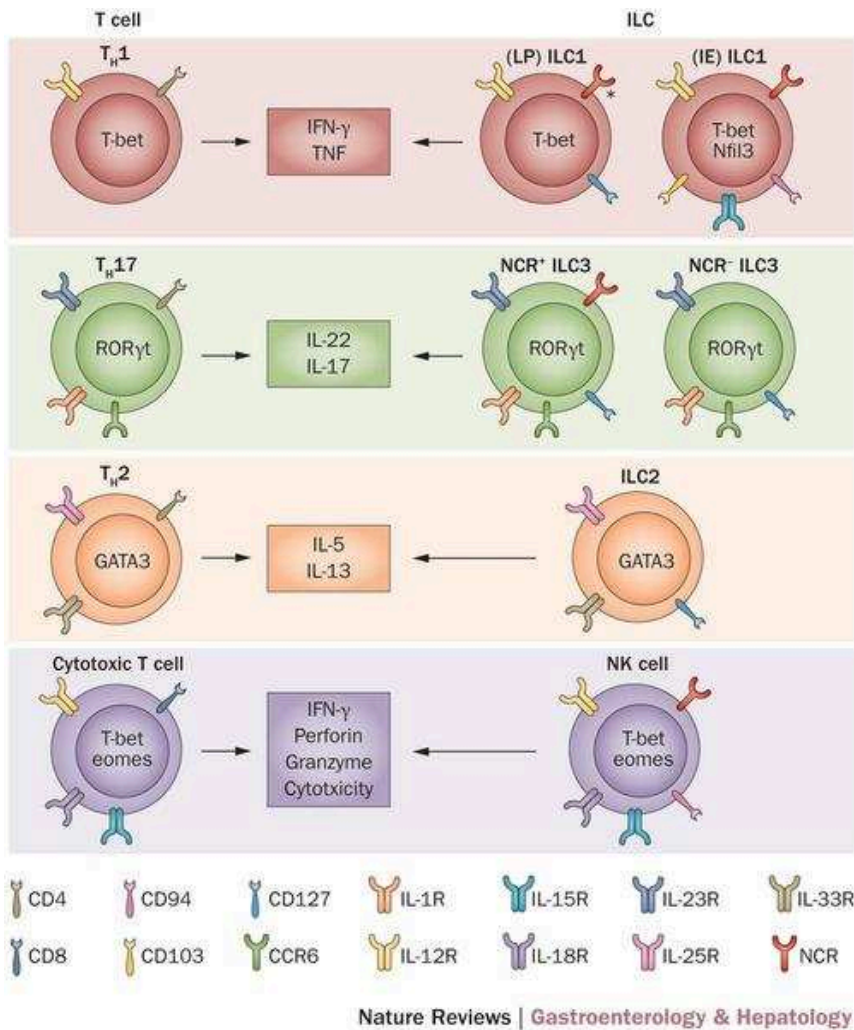
## II. Les cellules Natural Killer dans le microenvironnement tumoral

### 1. Caractéristiques générales

Les cellules Natural Killer (NK) sont des cellules du système immunitaire inné. Elles ont été observées pour la première fois par l'équipe de Kiessling en 1975 (Kiessling, Klein, Pross, et al. 1975; Kiessling, Klein, and Wigzell 1975). Il caractérise alors ces nouvelles cellules par leur capacité à lyser spontanément les cellules infectées ou tumorales sans activation préalable par les APC, au contraire des lymphocytes T.

Les cellules NK appartiennent à une famille plus large : les cellules lymphoïdes innées (ILC) (Artis and Spits 2015). Ces cellules résident en majorité dans les tissus épithéliaux. Les ILC sont subdivisées en 2 sous-groupes selon leur capacité cytotoxique et sécrétoire. Ainsi les cellules NK font partie des *Killer* ILC, auxquelles s'opposent les *Helper-like* ILC, en analogie avec la classification des lymphocytes T. Les Helper-like ILC sont classées en 3 groupes suivant leur profil d'expression cytokinique et leur facteur de transcription (**Figure 3**) :

- **Le groupe des ILC1** contient les ILC1 mais également les cellules NK conventionnelles. Les cellules de ce groupe sécrètent des cytokines Th1, l'IFN $\gamma$  et le *Tumor necrosis factor  $\alpha$*  (TNF $\alpha$ ). Les deux types cellulaires de ce groupe expriment les facteurs de transcription eomesodermine (Eomes) mais également T-bet (Bernink et al. 2013; Klose et al. 2017; Spits, Bernink, and Lanier 2016). Cependant une fraction de cellules NK du sang périphérique perdent l'expression d'Eomes (Knox et al. 2014).
- **Le groupe des ILC2** contient les cellules ILC2 qui expriment le facteur de transcription GATA3 et sécrètent des cytokines de type Th2 (Mjosberg et al. 2011; Monticelli et al. 2011). Cependant des travaux récents ont montré que les ILC2 pouvaient produire de l'IFN $\gamma$  après stimulation par l'IL-12 (Silver et al. 2016).
- **Le groupe des ILC3** : les cellules de ce groupe expriment le facteur de transcription ROR $\gamma$ t et sécrètent des cytokines de type Th17 (Buonocore et al. 2010; Cella et al. 2009). Les ILC3 présentent également une plasticité car sous certaines conditions, elles peuvent se différencier en ILC1 (Klose et al. 2013).



**Figure 3:** Les différents groupes de la famille des ILC avec leur parallèle chez les lymphocytes T. Les ILC1, comme les LT Th1 produisent de l'IFN $\gamma$  et du TNF $\alpha$ . Les ILC3, sont similaires au LT Th17 et sécrètent de l'IL-22 et de l'IL-17. Les ILC2, de manière similaire au LT Th2 produisent de l'IL-5 et de l'IL-13. Les cellules NK, qui font parties des ILC1, sont similaires au LT CD8 cytotoxiques via leur sécrétion d'IFN $\gamma$  et de perforine/granzyme. D'après Goldberg et al. 2015. LP: Lamina propria. IE: intra-épithéliale.

Les cellules NK représentent 5 à 20% des lymphocytes du sang et se renouvellent en 2 semaines environ. On les retrouve également dans la moelle osseuse, le foie, l'utérus, la rate, les poumons, les organes lymphoïdes secondaires (OLS) ainsi que dans les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (MALT) (Yokoyama, Kim, and French 2004). Ils possèdent à la fois des capacités lytiques contre les cellules transformées, infectées, mais également des fonctions immunomodulatrices de par leur capacité à sécréter des cytokines, majoritairement de l'IFN $\gamma$  et du TNF $\alpha$  (Chester, Fritsch, and Kohrt 2015). Les cellules NK sont caractérisées chez l'Homme par l'absence d'expression du marqueur CD3 mais par la présence du marqueur CD56 ou NCAM (*Neural cell adhesion molecule* protéine neuronale

d'adhésion) (Lanier et al. 1989). Le CD56 permet de définir 2 sous-populations fonctionnellement et phénotypiquement hétérogènes :

- **Les cellules NK CD56<sup>bright</sup>** : représentent 10% des cellules NK du sang mais sont très abondantes dans les OLS de par leur expression de CCR7, CXCR3 et CD62L (des récepteurs permettant l'adressage des cellules NK dans les OLS) où elles représentent 75% des lymphocytes NK. Elles sont faiblement cytotoxiques mais sont capables de produire de grandes quantités de cytokines et de chimiokines (Cooper, Fehniger, and Caligiuri 2001). Elles expriment également le CCR6 et CCR5 leur permettant de migrer vers certains environnements inflammatoires, comme ceux des tumeurs (Campbell et al. 2001; Cooper, Fehniger, and Caligiuri 2001; Stojanovic and Cerwenka 2011). Cette sous-population NK joue également un rôle dans la réponse immunitaire adaptative en régulant les cellules dendritiques et la polarisation Th1 des lymphocytes T (Magri et al. 2011; Martin-Fontecha et al. 2004).
- **Les cellules NK CD56<sup>dim</sup>** : représentent 90% des cellules NK du sang. Elles ne possèdent que de faibles capacités sécrétrices mais sont fortement cytotoxiques et expriment le récepteur de faible affinité au fragment constant (Fc) des Immunoglobulines G (IgG) (FcγRIIIA ou CD16). Ces cellules dérivent des CD56<sup>bright</sup> par perte du NKG2A et du CD62L et par acquisition du CD57 et des *Killer-cell immunoglobulin-like receptors* (KIR) (Björkström et al. 2010; Romagnani et al. 2007). Elles sont capables de migrer vers les sites de l'inflammation en périphérie du fait de l'expression de récepteurs aux chimiokines CXCR1 et CXCR3. Messaoudene et collègues ont également décrit une population rare CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>+</sup> présente dans les métastases ganglionnaires de mélanome avec un fort potentiel cytotoxique (Messaoudene et al. 2014).

## 2. Ontogénie des cellules NK

Comme les autres cellules lymphoïdes, les cellules NK dérivent de cellules souches hématopoïétiques (HSC), des cellules pluripotentes CD34<sup>+</sup> qui résident dans la moelle osseuse (Galy et al. 1995). A partir des HSC se développe un progéniteur lymphoïde commun (CLP) qui se différencie en LT, LB ou lymphocyte NK (Kondo, Weissman, and Akashi 1997).

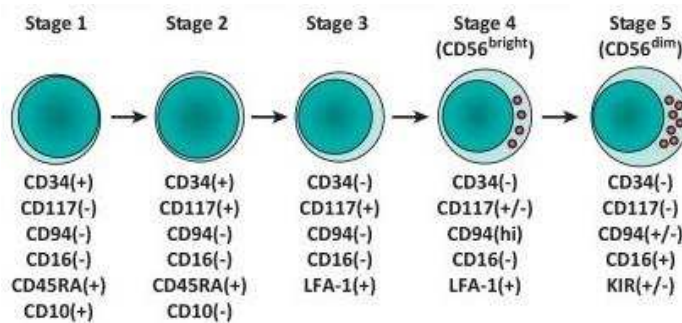
Les cellules NK se développent dans le foie foetal puis dans la moelle osseuse à la naissance (Fehniger and Caligiuri 2001). Plusieurs études ont proposé une hypothèse alternative à l'origine des cellules NK en soutenant que les progéniteurs myéloïdes communs (CMP) et les précurseurs des granulocytes-monocytes pouvaient également se développer en cellules NK (Grzywacz et al. 2011; Perez et al. 2003). Les cellules NK issues du CNP sont CD56<sup>bright</sup> tandis que celles dérivant du CMP seraient CD56<sup>dim</sup>.

La différenciation des lymphocytes NK nécessite la présence de différentes cytokines. Il a été démontré *in vitro* que le *stem cell factor* (SCF), le *fibromyalgia syndrome-like tyrosine kinase-3 ligand* (Flt3-L), l'IL-7, l'IL-2 et l'IL-15 sont particulièrement importants. Ainsi le SCF et le Flt3-L induisent la différenciation des HSC en cellules précurseurs hématopoïétiques (HPC) et la sensibilité à l'IL-2 et à l'IL-15 qui sont essentielles à la différenciation des cellules NK (Caligiuri 2008; Park et al. 2013). L'équipe de Caligiuri a décrit 5 stades différents de développement des cellules NK à partir des HSC (Freud, Yu, and Caligiuri 2014) (**Figure 4**):

- **Stade 1** : CD34<sup>+</sup>CD117<sup>-</sup>CD94<sup>-</sup> (cellules progénitrices NK) : expriment les marqueurs des CLP CD10 et CD45RA mais ne possèdent pas le CD122 (IL-2/IL-15R $\beta$ ) et ne répondent donc pas à l'IL-15. Il a été montré *in vitro* que l'ajout de Flt3-L, d'IL-3 et d'IL-7 dans le milieu faisait passer les cellules au stade 2.
- **Stade 2** : CD34<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup>CD94<sup>-</sup> (précurseurs des cellules NK) : expriment le CD122 et sont sensibles à l'IL-15. Ils expriment également faiblement CD56. *In vitro*, ces cellules peuvent se différencier en LT, cellules dendritiques (DC) ou cellules du stade 3. En présence d'IL-2 et d'IL-15, elles peuvent également se développer en cellules NK CD56<sup>bright</sup> (Freud et al. 2005).
- **Stade 3** : CD34<sup>-</sup>CD117<sup>+</sup>CD94<sup>-</sup> (cellules NK immatures) : perte de l'expression du CD34 marquant la perte du potentiel de différenciation en LT ou DC et l'engagement dans la voie des cellules NK. Ces cellules expriment également le CD56, CD127, *IL-7 receptor subunit  $\alpha$*  (IL-7R $\alpha$ ), CD161 et le lymphocyte *function-associated antigen 1* (LFA-1). Ces cellules NK immatures sont incapables de produire de l'IFN $\gamma$  et n'expriment pas de KIR ou le récepteur inhibiteur CD94/NKG2A.
- **Stade 4** : CD56<sup>bright</sup>CD34<sup>-</sup>CD117<sup>+/-</sup>CD94<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> (cellules NK CD56<sup>bright</sup>) : expriment le CD94/NKG2A, les récepteurs activateurs NKp46 et NKG2D mais perdent le

CD117 et le CD127. Ces cellules sont capables de produire de l'IFN $\gamma$  et de la perforine, ce qui les rend fonctionnelles. Ce sont les mêmes cellules NK CD56<sup>bright</sup> qui sont présentes dans le sang.

- **Stade 5** : CD56<sup>dim</sup>CD34<sup>-</sup>CD117<sup>-</sup>CD94<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> (cellules NK matures CD56<sup>dim</sup>) : expriment les KIR et le CD16. L'expression de CD56 a été également observée *in vivo* aux stades 2 et 3. Ces cellules NK matures vont d'abord passer par une étape où elles expriment le CD62L mais pas le CD57 avant de devenir des cellules NK pleinement différenciées CD62L<sup>-</sup>CD57<sup>+</sup> (Juelke et al. 2010; Lopez-Vergès et al. 2010).



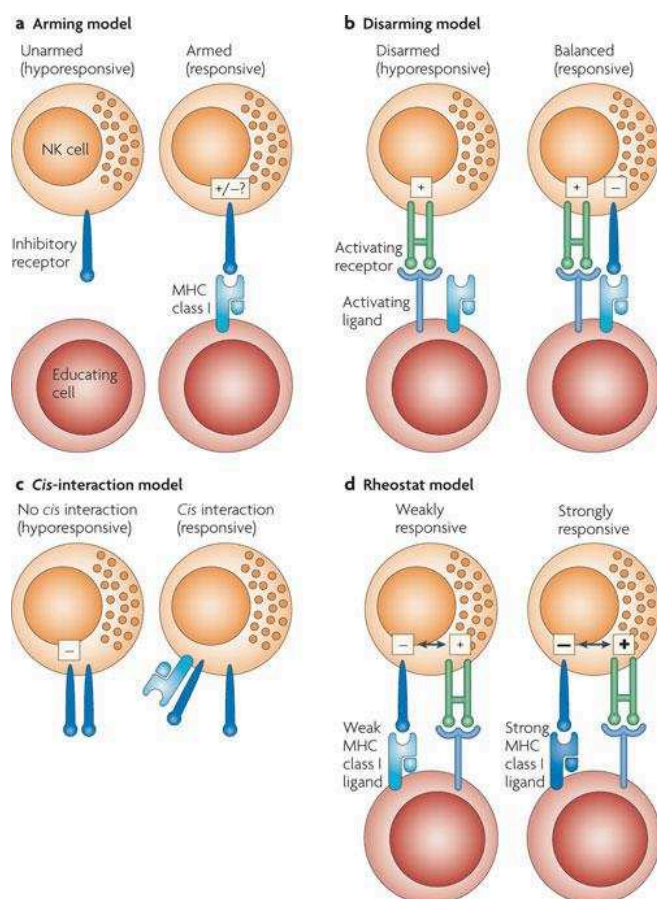
**Figure 4** : Les 5 étapes de l'ontogénèse des cellules NK. Les cellules NK sont issues des cellules souches hématopoïétiques CD34<sup>+</sup> qui se différencient, entre autre, en progéniteur lymphoïde commun qui se différenciera en cellule NK via 5 étapes au cours desquelles la cellule perdra le CD34 et le CD117 mais acquerra le CD94 et le CD56. Modifié d'après Yu, Freud, and Caligiuri 2013.

Au cours du développement, les cellules NK acquièrent également leurs fonctions effectrices contre les cellules cibles et la tolérance vis-à-vis des cellules du « soi » (Kim et al. 2005). Ainsi, il a été rapporté que des cellules NK matures possédant un déficit d'expression des récepteurs inhibiteurs reconnaissant le CMH I (les KIR chez l'Homme, le Ly49 chez la souris, le CD94/NKG2A chez les 2 espèces) sont hyporéactives en comparaison avec les cellules NK exprimant au moins un récepteur inhibiteur (Anfossi et al. 2006; Kim et al. 2005). De plus, il a été montré dans des modèles murins que la déficience en  $\beta$ 2 microglobuline (B2m), une protéine faisant partie du CMH I, rend les cellules NK également hyporéactives (Bix et al. 1991; Höglund et al. 1991; Liao et al. 1991).

Plusieurs modèles ont été avancés pour expliquer comment l'interaction entre le CMH I et les récepteurs inhibiteurs permet l'éducation des cellules NK (**Figure 5**) :

- **Le « arming model »** propose que les cellules NK sont initialement hyporéactives et que l'engagement des récepteurs inhibiteurs avec le CMH I sur des cellules du « soi » est nécessaire pour l'acquisition de leurs compétences fonctionnelles (Kim et al. 2005; Orr and Lanier 2010). Une variante de ce modèle a été proposée chez la souris : l'interaction Cis entre le récepteur inhibiteur murin Ly49A et les molécules du CMH I d'une même cellule est nécessaire à l'éducation de la cellules NK (Chalifour et al. 2009).
- **Le « disarming model »** postule au contraire que les cellules NK sont initialement fonctionnelles. Cependant en l'absence de récepteurs inhibiteurs reconnaissant les molécules du CMH I, les cellules NK deviennent anergiques (Orr and Lanier 2010; Raulet 2006).
- **Le modèle « du rhéostat »** propose d'associer les 2 précédents modèles en prenant en compte la force totale ainsi que la fréquence de l'engagement des récepteurs inhibiteurs. Il est en effet plus probable que l'éducation des cellules NK se fasse suivant une balance de signaux activateurs et inhibiteurs plutôt que suivant un système binaire (Brodin, Kärre, and Höglund 2017; Joncker et al. 2009).





Nature Reviews | Immunology

**Figure 5:** Les différents modèles d'éducation des cellules NK. a. le « arming model » propose que les cellules NK initialement hyporéactives soient éduquées via l'engagement des récepteurs inhibiteurs reconnaissant le CMH I des cellules du « sois ». b. le « disarming model » postule que les cellules NK sont originellement fonctionnelles et que l'absence de récepteurs inhibiteurs reconnaissant le CMH I entraîne leur anergie. c. Le modèle d'interaction Cis est une variante du « arming model » où le récepteur inhibiteur interagit avec le CMH I présent sur la même cellule. d. le modèle « du rhéostat » associe les modèles du « arming » et du « disarming », prenant un compte la force de l'interaction entre les récepteurs inhibiteurs et le CMH I pour l'éducation des cellules NK. Le D'après Höglund and Brodin 2010.

Récemment, différentes études ont montré la plasticité de ce système d'éducation des cellules NK. Ainsi des lymphocytes NK matures transférés dans des souris déficientes en CMH I développent une hyporéactivité puis une tolérance vis-à-vis des cellules déficientes en CMH I. Au contraire, des cellules NK matures hyporéactives issues de souris déficientes en CMH I transférées dans des souris exprimant le CMH I deviennent cytotoxiques (Elliott, Wahle, and Yokoyama 2010; Joncker et al. 2010). Cette plasticité s'observe également dans un contexte infectieux pouvant mener à une rupture de la tolérance (Sun and Lanier 2008). De manière intéressante, la stimulation de cellules NK hyporéactives issues de souris déficientes pour le CMH I par de l'IL-2 permet la lyse efficace des cellules cibles par ces

mêmes cellules NK (Salcedo et al. 1998). Il apparaît alors que l'éducation des cellules NK est un processus continu tout au long de la vie de la cellule et qu'elle dépend de stimuli présents dans son environnement. Ainsi la possibilité de « rééduquer » des cellules NK rendues anergiques par le microenvironnement tumoral apparaît comme une cible thérapeutique intéressante dans le domaine de l'immunothérapie.

### 3. Les fonctions des cellules NK

Les lymphocytes NK sont des cellules majeures du système immunitaire inné du fait de leur capacité unique à lyser des cellules cibles sans activation préalable par un antigène spécifique (au contraire des lymphocytes T) notamment en détectant une diminution ou une transformation des molécules du CMH I exprimées à la surface des cellules. L'activité des cellules NK passe par deux mécanismes : leur cytotoxicité (directe ou indirecte) et la production de cytokines (Caligiuri 2008; Vivier et al. 2008).

#### A. La fonction cytotoxique

La fonction cytotoxique des cellules NK est exercée majoritairement par les cellules  $CD56^{\text{dim}}CD16^+$  via 2 mécanismes : la libération de granules lytiques (via la cytotoxicité dépendante des anticorps, ADCC ou après activation de récepteurs activateurs) et l'interaction avec des récepteurs de mort tels que Fas ou *TNF-related apoptosis inducing ligand receptor* (TRAIL-R).

Lors de l'interaction d'une cellule NK avec sa cellule cible, un réarrangement membranaire spécifique intervient : c'est la synapse immunologique (IS) (Voskoboinik, Whisstock, and Trapani 2015). Lors de la formation de l'IS, les récepteurs activateurs des NK sont engagés, entraînant le recrutement des granules lytiques contenant la perforine et des granzymes (des sérines protéases proapoptotiques) à la membrane de la cellule NK et dont le contenu est libéré par un mécanisme d'exocytose  $Ca^{2+}$ -dépendant (Krzewski and Coligan 2012). La perforine libérée va créer des pores dans la membrane de la cellule cible à travers lesquels les granzymes vont passer, délivrant un message proapoptotique en activant la voie des caspases (Darmon, Nicholson, and Bleackley 1995; Tay and Welsh 1997). Lors de la libération des granules lytiques, *lysosomal-associated membrane protein* (LAMP-1)/CD107a est exprimé à la membrane de la cellule NK. Il a été avancé que l'expression de cette

protéine protégerait la cellule NK de la perforine et des granzymes (Cohnen et al. 2013). Dans un contexte tumoral, il a été montré que les granzymes n'étaient pas essentiels à l'élimination des tumeurs par les cellules NK (Davis, Smyth, and Trapani 2001; Smyth, Street, and Trapani 2003) au contraire de la perforine (van den Broek et al. 1996).

Un autre moyen d'élimination des cellules cibles par les cellules NK passe par les récepteurs de mort. Ainsi les lymphocytes NK expriment à leur surface des ligands, Fas ligand (FasL) et TRAIL, des récepteurs de la famille du TNF Fas et TRAIL-R exprimés à la surface des cellules cibles. Lorsque ces récepteurs sont activés, l'apoptose est déclenchée via la voie des caspases (Ashkenazi 2002). TRAIL est exprimé constitutivement à la surface de certaines cellules NK et est induit sur la majorité des lymphocytes NK après stimulation par l'IL-2, l'IFN $\gamma$  ou l'IL-15 (Kashii et al. 1999; Zamai et al. 1998). FasL est exprimé à la surface des NK après activation par le CD16 ou l'IL-2 (Chua, Serov, and Brahmi 2004).

Les cellules NK sont capables, comme d'autres cellules du système immunitaire, de se lier aux cellules recouvertes d'anticorps via le récepteur de faible affinité au fragment Fc CD16. Après interaction du CD16 avec son ligand, il y a dégranulation des granules de perforine/granzymes entraînant l'apoptose de la cellule cible : c'est l'ADCC (Vivier et al. 2011). Ce mécanisme est exploité par les traitements anti-tumoraux basés sur des anticorps thérapeutiques (Collins et al. 2012). Le Rituximab et le Trastuzumab ont été les premiers anticorps humanisés approuvés pour les traitements anti-tumoraux. Le Rituximab, qui cible le CD20 exprimés par les LB, est indiqué pour les lymphomes non-Hodgkiniens ainsi que les leucémies lymphoïdes chroniques alors que le Trastuzumab cible le *human epidermal growth factor receptor 2* (HER2), il est prescrit pour les cancers du sein localisés ou métastatiques exprimant HER2 et les cancers gastriques métastatiques (Abulayha et al. 2014; Slamon et al. 2011).

## B. La sécrétion de cytokines

Les cellules NK sont également une source importante de cytokines, particulièrement les CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>. Ces cellules sont capables de sécréter de grande quantité d'IFN $\gamma$ , de TNF $\alpha$ , d'IL-10, d'IL-3, et de *granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor* (GM-CSF) ainsi que de chimiokines (IL-8), *macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$*  (MIP-1 $\alpha$ ), MIP-1 $\beta$  et *regulated upon activation, normally T-expressed, and secreted* (RANTES) (Cooper, Fehniger,

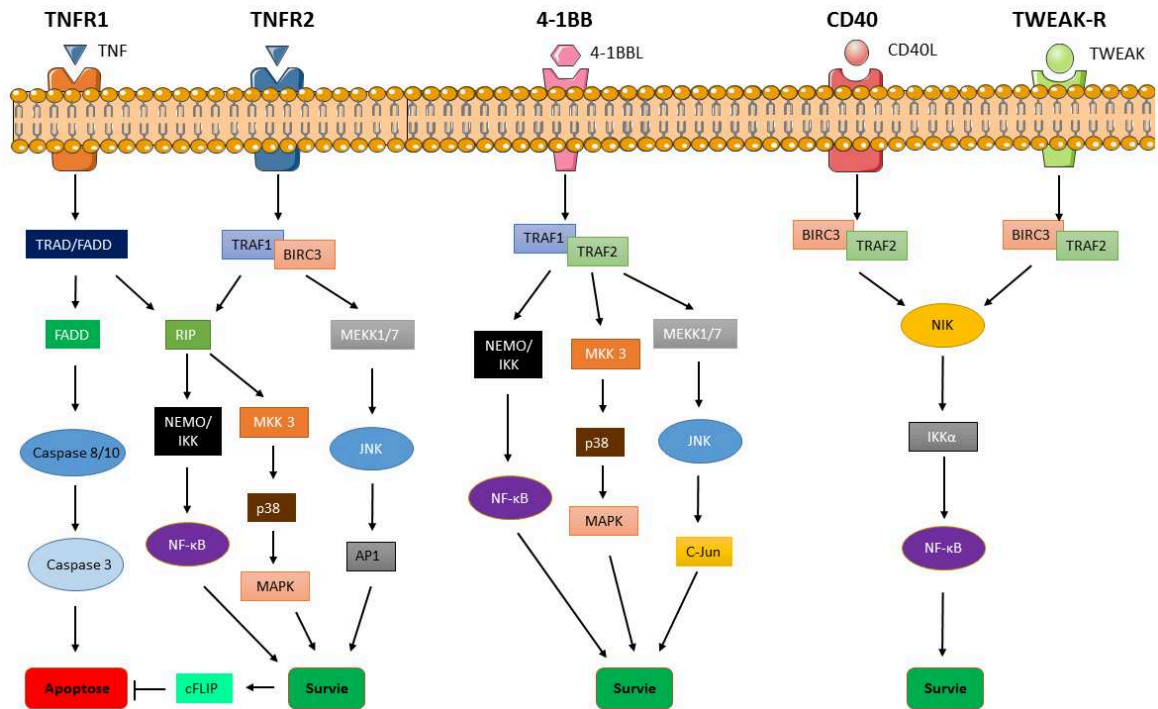
and Caligiuri 2001) influençant positivement (Krebs et al. 2009; Robbins et al. 2007) ou négativement (Andrews et al. 2010) l'immunité adaptative. La sécrétion de cytokines nécessite une activation préalable des cellules NK par des cytokines (IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, Interférons  $\alpha$  et  $\beta$ ) produites par les DC, les macrophages activés ou des cellules infectées, ou l'engagement d'un récepteur activateur (Cooper, Fehniger, Turner, et al. 2001; Zwirner and Domaica 2010). Les cellules NK ainsi activées par des cytokines présentent une augmentation de leur prolifération et de leurs fonctions (Zwirner and Domaica 2010).

La cytokine majoritairement produite par les lymphocytes NK est l'IFN $\gamma$  (IFN de type II). Cette cytokine joue un rôle critique dans l'immunité innée mais aussi adaptative en activant la réponse antivirale et anti-tumorale (Ikeda, Old, and Schreiber 2002). Il a d'ailleurs été observé que les souris déficientes en IFN $\gamma$  développaient des lymphomes et des tumeurs pulmonaires spontanément (Street et al. 2002). Le récepteur à l'IFN $\gamma$  est l'*Interferon gamma receptor* (IFNGR). Il est composé de deux chaînes IFNGR1 transmembranaires liant le ligand, associées à deux chaînes IFNGR2 transmembranaires transduisant le signal en étant associées aux Janus tyrosine kinase 1/2 (JAK1/2). Lorsque le récepteur est activé, JAK1 et JAK2 phosphorylent les queues cytoplasmiques des IFNGR2 permettant le recrutement du *signal transducer and activator of transcription 1* (STAT1). STAT1 est alors phosphorylé et s'homodimérise avant de migrer dans le noyau, induisant la transcription des gènes répondeurs en se liant au *IFN-gamma-activated site* (GAS) (Galani et al. 2016). L'IFN $\gamma$  peut induire l'expression des molécules de CMH II sur les APC (Pai et al. 2002), augmenter l'expression du CMH I à la surface des cellules (Schroder et al. 2004), réguler la différenciation l'activation et l'homéostasie des LT (Agnello et al. 2003), activer les macrophages, augmenter la phagocytose et induire la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Hu, Chakravarty, and Ivashkiv 2008).

Le TNF $\alpha$  est une autre cytokine pro-inflammatoire majeure produite par les cellules NK. Il joue un rôle important dans la défense de l'organisme contre les pathogènes mais également dans l'homéostasie via l'organisation des organes lymphoïdes et la formation des centres germinaux (Liu et al. 1998; Marino et al. 1997; Pasparakis et al. 1996). La fonction pro-inflammatoire du TNF $\alpha$  se traduit par sa capacité à activer l'endothélium vasculaire, recruter des cellules immunitaires dans les tissus enflammés et promouvoir la destruction tissulaire (Feldmann 2009). Le TNF $\alpha$  est d'abord sécrété à la membrane avant d'être clivé par

la métalloprotéinase *TNF $\alpha$  converting enzyme* (TACE/ADAM17) (Wajant, Pfizenmaier, and Scheurich 2003). Le TNF $\alpha$  peut se lier à deux récepteurs : le *TNF receptor 1* (TNFR1) et le TNFR2. Le TNFR1 est constitutivement exprimé par la majorité des cellules alors que le TNFR2 est exprimé préférentiellement par les cellules du système immunitaire. Les deux récepteurs lient le TNF $\alpha$  membranaire mais le TNFR1 possède une affinité plus forte pour le TNF $\alpha$  membranaire que le TNFR2 (Grell et al. 1998). Lorsqu'il se lie au TNFR1, les protéines *TNF receptor associated death domain* (TRADD) et *receptor interacting protein* (RIP) sont recrutées en interagissant avec le domaine de mort de la queue cytoplasmique de TNFR1. *TNF-receptor associated factor 2* (TRAF2), lié à TRADD, phosphoryle alors l'*inhibitor of I $\kappa$ B kinase* (IKK). Ce dernier va alors libérer le *nuclear factor  $\kappa$ B* (NF- $\kappa$ B) qui se relocalise dans le noyau et active les gènes répondeurs (Perkins 2007) (**Figure 6**). TRAF2 et RIP activent aussi la voie des *mitogen-activated protein* (MAP) kinases. L'activation des voies NF- $\kappa$ B et MAPK est favorisée par l'ubiquitinylation de RIP par la *cellular inhibitor of apoptosis protein-1* (cIAP1, aussi appelée le *Baculoviral IAP Repeat Containing 2*, BIRC2) et cIAP2/BIRC3 (Shu, Takeuchi, and Goeddel 1996). Le TNFR1 peut également induire la mort cellulaire via deux voies de signalisation. La première est la nécrose via la génération de ROS par l'activation prolongée de la voie *JUN N-Terminal Kinase* (JNK) (Lin et al. 2004). La deuxième par la voie des caspases, TRADD recrutant *Fas-associated death domain* (FAD) induisant le recrutement des caspases 8 et 10 initiant l'apoptose (Sprick et al. 2000). Lorsqu'il est activé, TNFR2 ne peut induire de mort cellulaire du fait de l'absence de domaine de mort dans son domaine intracytoplasmique. Il induit alors l'activation des NF- $\kappa$ B et MAP kinases en recrutant directement TRAF2, qui recrute à son tour TRAF1, cIAP1 et cIAP2 (Rothe et al. 1995). TNFR2 est également capable d'activer la voie Akt induisant la prolifération et la migration (Pan et al. 2002; R. Zhang et al. 2003). Le TNF $\alpha$  a été originellement décrit comme un facteur induisant la nécrose de tumeurs (Carswell et al. 1975). Cependant les premiers essais d'utilisation de TNF $\alpha$  recombinant en tant que thérapie anticancéreuse se sont soldés par un échec du fait de l'induction d'une réaction inflammatoire massive. Néanmoins l'injection de TNF $\alpha$  associé au melphalan est un traitement approuvé pour le traitement de sarcomes locaux (van Horssen, Ten Hagen, and Eggermont 2006). Le TNF $\alpha$  stimule la migration des lymphocytes, augmente la phagocytose et la production d'IL-1 par les macrophages ainsi que la vasoconstriction des vaisseaux sanguins (Wajant et al. 2003). Cependant le TNF $\alpha$  peut également jouer un rôle pro-tumoral en induisant la prolifération et la survie des cellules

tumorales et en entretenant un environnement immunosuppresseur en activant les MDSC et les Treg (Kalliolias and Ivashkiv 2015).



**Figure 6:** Voies de signalisation de différents récepteurs de la famille des TNFRSF. Le TNF peut se fixer à 2 récepteurs, le TNFR1 et le TNFR2. L'activation du TNFR1 peut conduire à l'apoptose de la cellule via la voie des caspases. Cependant elle peut aussi promouvoir la survie via le recrutement de RIP qui active les voies NF-κB et les MAP kinases. L'activation de TNFR2 permet le recrutement de TRAF1 ainsi que de BIRC3 induisant la survie cellulaire par les voies NF-κB, MAP kinases et JNK. TRAF1 intervient également dans la signalisation du récepteur 4-1BB où il active les voies de survies et de prolifération NF-κB, MAP kinases et JNK. BIRC3 permet l'activation de la voie NF-κB après fixation de CD40L et de TWEAK sur le récepteur respectif.

Les cellules NK peuvent donc jouer un rôle immunorégulateur via leurs sécrétions cytokiniques mais également en interagissant avec les DC. Ainsi l'IL-12, sécrété majoritairement par les DC myéloïdes BDCA1/CD1c<sup>+</sup> et les DC myéloïdes CLEC9A (*C-Type Lectin Domain Family 9 Member A*)<sup>+</sup>BDCA3 (thrombomoduline)<sup>+</sup> induit l'activation des cellules NK en augmentant leur cytotoxicité, leur production d'IFN $\gamma$  et favorise la polarisation Th1. Cet effet peut être potentialisé par l'IL-18 qui induit l'expression de l'IL-12R sur les lymphocytes NK (Walzer et al. 2005). Il a également été montré que l'IL-15 produit par les DC augmentait la prolifération des cellules NK (Munz et al. 2005). De plus, les exosomes dérivés des DC (DEX) issus de DC immatures expriment le ligand du récepteur activateur NKp30 *BCL2-associated athanogene 6* (BAG6) et la *Heat shock protein 70* (HSP70), activant les cellules NK (Elsner et al. 2007; Simhadri et al. 2008). Viaud et collègues ont montré que cette

activation des cellules NK par les DEX passe par l'IL-15R $\alpha$  chez la souris et le NKG2D chez l'Homme (Viaud et al. 2009).

Giuliani et collègues ont décrit une population de cellules NK non cytotoxiques CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>NKp30<sup>+</sup>NKp44<sup>+</sup>NKp46<sup>+</sup>CD94<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> induits *in vitro* capables de diminuer la réponse immunitaire via l'expression et la sécrétion de HLA-G (une molécule immunosuppressive) ainsi que d'IL-10 et d'IL-21 (Giuliani et al. 2008). Ce phénotype est très proche des cellules NK de la décidua lors d'une grossesse. Ces lymphocytes NK contribueraient à la tolérance fœto-maternelle (Tilburgs et al. 2015).

### C. Les cellules NK mémoires

Longtemps considéré comme propre à l'immunité adaptative, le développement d'une mémoire immunitaire a récemment été mis en évidence chez les cellules NK. Ainsi chez des souris infectées par le cytomégalo virus murin (MCMV), les cellules NK Ly49H<sup>+</sup>, qui sont capables de reconnaître la glycoprotéine virale m157, subissent une expansion « clonale » durant l'infection générant une mémoire à long terme des cellules NK après une phase de contraction. Ces cellules NK sont capables de reconnaître le MCMV 70 jours après l'infection et prolifèrent après re-stimulation par le virus *ex vivo* avec une augmentation de leurs fonctions (Sun, Beilke, and Lanier 2009, 2010). Des cellules NK mémoires ont été décrites dans d'autres infections virales murines comme le virus de la vaccine ou le virus de l'herpès (Abdul-Careem et al. 2012; Gillard et al. 2011). Une population de cellules NK mémoires a également été décrite chez l'Homme, une sous-population NKG2C<sup>+</sup> capables de proliférer après une infection au cytomégalo virus humain (HCMV) et représentant plus de 80% des cellules NK a été observée. Ces lymphocytes NK se réactivent après une nouvelle infection au HCMV et persistent plus d'un an après la primo-infection (Kuijpers et al. 2008). De plus, cette population a été également identifiée chez des patients séropositifs pour le HCMV et infectés par d'autres virus comme le virus de l'hépatite B chronique, le virus de l'hépatite C, le virus Hanta ou le virus du Chikungunya (Beziat et al. 2012; Björkström et al. 2011; Petitdemange et al. 2011).

Une autre sorte de mémoire a également été décrite : des cellules NK peuvent se « souvenir » d'un environnement cytokinique particulier (Cerwenka and Lanier 2016). Ainsi, Cooper et collègues ont montré que des lymphocytes NK préactivés par l'IL-12 et l'IL-18

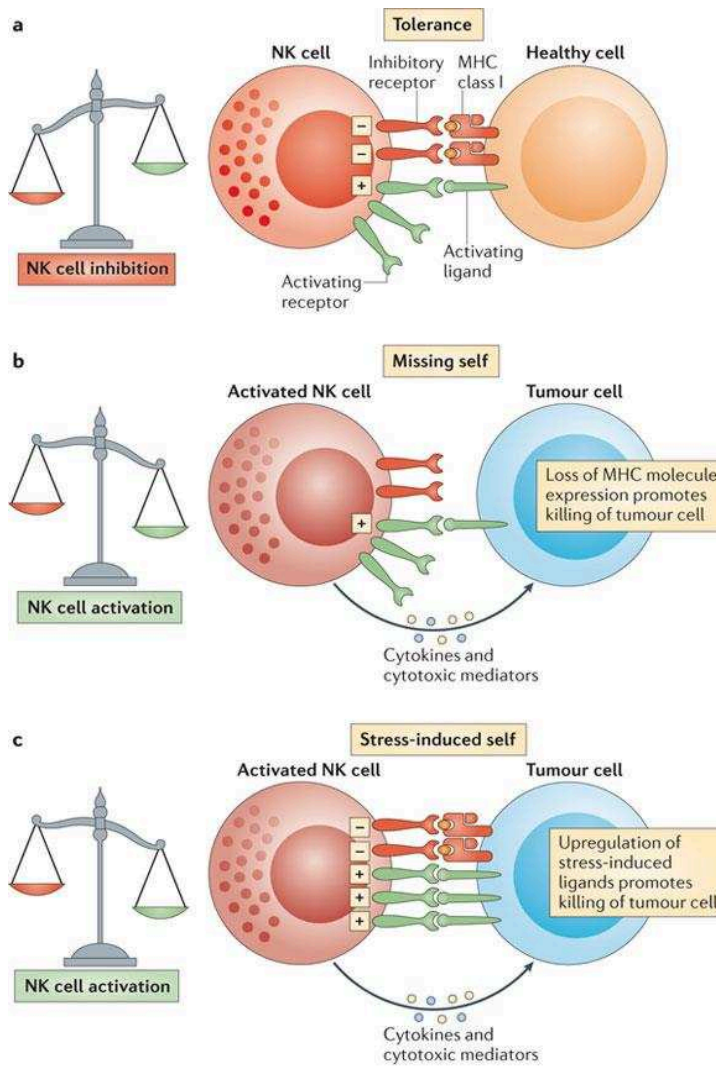
transférés dans des souris naïves sont capables de produire de grandes quantités d'IFN $\gamma$  lorsque qu'ils sont réexposés aux mêmes cytokines pro-inflammatoires en comparaison avec des cellules NK transférées non préactivées (Cooper et al. 2009). Ces cellules NK préactivées présentent également une activité anti-tumorale plus importante (Ni et al. 2012).

#### 4. La reconnaissance des cellules cibles et les récepteurs des cellules NK

Les cellules NK présentent la capacité unique de reconnaître des cellules transformées sans activation préalable par un antigène spécifique et de les éliminer. Dès 1986, Kärre et collègues ont observé que les cellules NK étaient capables d'éliminer des cellules tumorales et que cette élimination était inversement proportionnelle à l'expression des molécules du CMH I à la surface des cellules tumorales (Kärre et al. 1986). A partir de cette observation, il a émis l'hypothèse que le CMH I protégeait les cellules du « soi » des cellules NK, c'est l'hypothèse du « *missing-self* » (Ljunggren et al. 1990). Des récepteurs se liant aux molécules du CMH I ont par la suite été identifiés chez la souris (Ly49, Karhofer, Ribaldo, and Yokoyama 1992) et chez l'Homme (KIR, Bryceson et al. 2006). Cependant des observations de cellules exprimant un faible taux de CMH I mais n'étant pas lysées par les cellules NK ont suggéré l'existence de récepteurs activateurs (Moretta et al. 2001).

Le mécanisme d'activation des cellules NK est en réalité une balance entre les signaux inhibiteurs des récepteurs inhibiteurs et les signaux activateurs des récepteurs activateurs. En reconnaissant les molécules du CMH I, les récepteurs inhibiteurs vont empêcher l'activation de la cellule NK, cependant les récepteurs activateurs vont reconnaître des molécules de stress (comme les MICA/MICB) et si ce signal activateur est plus fort que le signal inhibiteur, la cellule NK est activée et lyse la cellule cible (**Figure 7**) (Vivier et al. 2012).





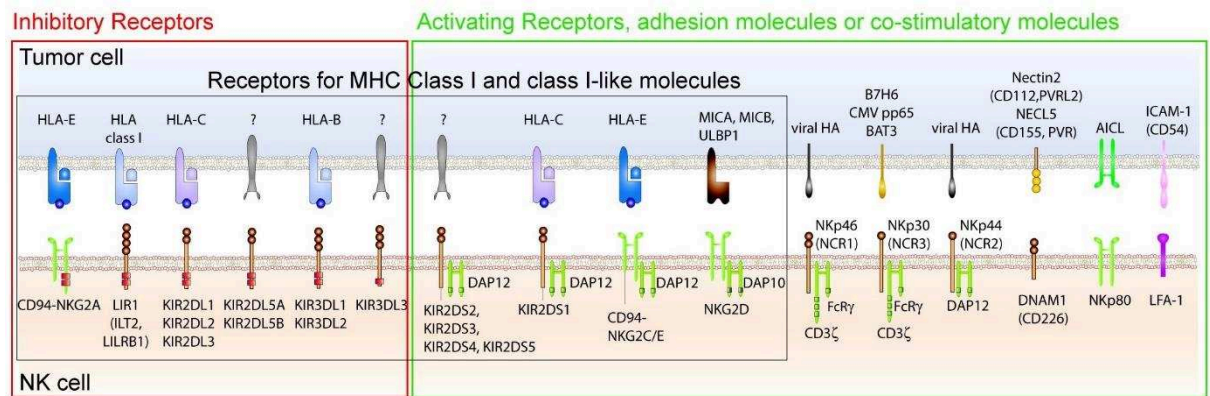
Nature Reviews | Immunology

**Figure 7:** le mécanisme d'activation des cellules NK est une balance entre les signaux inhibiteurs et ceux activateurs. La cellule NK est inhibée lorsque il y a plus de récepteur inhibiteur activés que de récepteurs activateurs stimulés (a). Si la cellule cible ne présente pas de CMH I, alors seuls les récepteurs activateurs seront stimulés et la cellule NK lysera la cellule cible (b). Lorsque que il y a plus de récepteurs activateurs stimulés que de récepteurs inhibiteur activés, la cellule NK est activée (c). D'après Vivier et al. 2012.

#### A. Les récepteurs activateurs

Les récepteurs activateurs sont associés à des protéines adaptatrices attachées à la membrane comme CD3 $\zeta$ , Fc $\epsilon$ R1 $\gamma$ , DAP10 ou DAP12. L'engagement de ces récepteurs active des protéines tyrosine kinases (PTK) de la famille Src qui vont phosphoryler les domaines *immunoreceptor tyrosine-based activation motif* (ITAM) de la queue cytoplasmique des protéines adaptatrices. Cela entraîne le recrutement de nouvelles PTK de la famille de Syk, comme Syk ou *Zeta chain of T-cell receptor associated protein kinase 70* (ZAP70) entraînant

la propagation du signal activateur (Watzl and Long 2010). La famille des récepteurs activateurs des cellules NK comprend notamment les *natural cytotoxicity receptors* (NCR), le CD16, le NKG2D, les homologues activateurs des récepteurs inhibiteurs (Ly49, KIR) et le *DNAX accessory molecule-1* (DNAM-1) (**Figure 8**).



**Figure 8:** Les récepteurs activateurs et inhibiteurs chez l'Homme avec leurs ligands respectifs. Les récepteurs inhibiteurs reconnaissent le CMH I et comprennent la famille des récepteurs KIRxDL et le CD94/NKG2A. Les récepteurs activateurs reconnaissent des molécules de stress et comprennent la famille des récepteurs KIRxDS, les NCR, le CD16, le NKG2D et DNAM-1. Modifié d'après Fregni et al. 2012.

#### a. Les Natural cytotoxicity receptor (NCR)

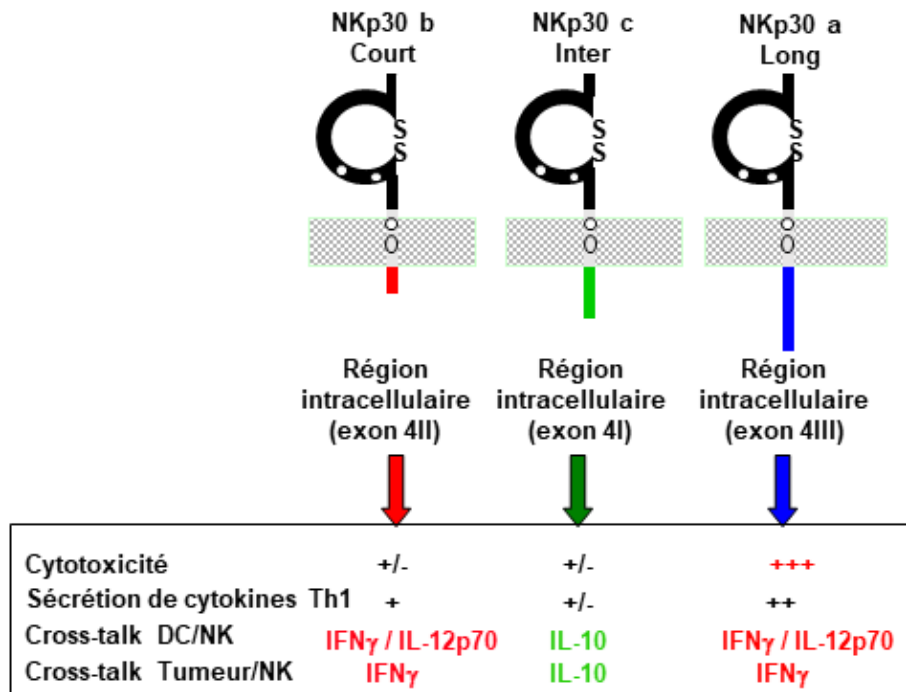
Les NCR sont une famille de récepteurs activateurs jouant un rôle critique dans la cytotoxicité des cellules NK. Trois NCR ont été décrits chez l'Homme : le NCR1 (NKp46), le NCR2 (NKp44) et le NCR3 (NKp30). NKp46 et NKp30 sont exprimés constitutivement sur les cellules NK au contraire de NKp44 qui nécessite une activation préalable de la cellule (Cantoni et al. 1999). La densité membranaire de ces récepteurs a été corrélée avec l'activité cytotoxique des cellules NK (Sivori et al. 1999). Les NCR semblent partager leur voie de signalisation car il a été observé que leur expression et leur fonction étaient coordonnées (Augugliaro et al. 2003). De plus, il a été montré que la diminution de l'expression des NCR représentait un mécanisme d'échappement aux cellules NK (Costello et al. 2002; De Maria et al. 2003). Aussi, des molécules comme le TGF $\beta$  ou les corticoïdes seraient capables de diminuer l'expression des NCR (Castriconi et al. 2003; Vitale et al. 2004). Les caractéristiques des différents NCR sont les suivantes :

- NKp46** : présente un domaine extracellulaire caractérisé par deux Ig-C2 (Pessino et al. 1998). Il est le seul récepteur NCR possédant un équivalent chez la souris. Son expression a été observée également chez des LT intraépithéliaux de patients atteints de maladie cœliaque (Meresse et al. 2006), chez des LT CD8<sup>+</sup> issus de sang de cordon ombilical (Tang et al. 2008), chez une population minime de NKT chez l'Homme et la souris (Yu et al. 2011), à la surface d'une sous-population de ILC3 (Verrier et al. 2016). Les ligands de NKp46 n'ont pas encore été bien caractérisés. Il a été montré que l'Hémagglutinine (HA) et la Neuraminidase (NA) du virus de la grippe interagissaient directement avec NCR1 (Mandelboim et al. 2001). De même, la vimentine, protéine exprimée par les monocytes infectés par *Mycobacterium tuberculosis*, est reconnue par NKp46 (Garg et al. 2006). Narni-Mancinelli et collègues ont identifié également le facteur P du complément (aussi appelé Properdine) comme ligand de NKp46 (Narni-mancinelli et al. 2017). Bien qu'aucun ligand n'ait été identifié à l'heure actuelle, le NKp46 est directement impliqué dans la reconnaissance des cellules tumorales (Arnon, Markel, and Mandelboim 2006; Elboim et al. 2010). En effet, Glasner et collègues ont montré que les souris déficientes en NKp46 présentaient une augmentation du nombre de métastases tumorales (Glasner et al. 2012). De plus, Messaoudene et collègues ont démontré que l'expression de NKp46 prédisait la survie des patients atteints de mélanome métastatique (Messaoudene et al. 2016).
- NKp44** : Contrairement à NKp46 et à NKp30, NKp44 possède un domaine *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif* (ITIM). Son épissage alternatif serait responsable de l'existence de différentes isoformes dont une inhibitrice (Fuchs et al. 2005). NKp44 est exprimé à la surface des cellules NK activées ainsi que sur une sous-population de lymphocytes T  $\gamma\delta$  après activation (Vitale et al. 1998), de certaines DC plasmacitoïdes (Fuchs et al. 2005) et de manière constitutive par les lymphocytes NK de la decidua (Jabrane-Ferrat and Siewiera 2014). Comme NKp46, NKp44 est capable de se lier à l'HA et la NA du virus de la grippe (Arnon et al. 2001), au NKp44L, un ligand dont l'expression est induite par le VIH-1 dans les LT CD4<sup>+</sup> infectés (Baychelier et al. 2013; Vieillard, Strominger, and Debre 2005), ainsi qu'au *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA), le premier ligand identifié de NKp44. PCNA est exprimé par les cellules tumorales (Naryzhny

and Lee 2007) et lorsque qu'il se lie à NKp44, il diminue de la production d'IFN $\gamma$  par les cellules NK. Il s'agit donc d'un ligand inhibiteur dont la signalisation passerait par le motif ITIM de la partie intracytoplasmique de NKp44 (Hudspeth, Silva-Santos, and Mavilio 2013). Hershkovitz et collègues ont suggéré également que les héparanes sulfates contribuent à la reconnaissance des cellules tumorales par NKp44 (Hershkovitz et al. 2007).

- **NKp30** : son domaine extracellulaire est composé d'un seul domaine *Ig-like*. Il est exprimé par les cellules NK mais également par une sous-population de LT issus du sang de cordon après stimulation par l'IL-15 (Tang et al. 2008), sur les LT  $\gamma\delta$  et sur les cellules épithéliales endométriales (Kruse et al. 2014). L'IL-2 augmente son expression au contraire du TGF $\beta$  qui la réduit. L'épissage alternatif permet l'existence de six isoformes dont trois sont majoritairement exprimées dans les tissus : NKp30a, NKp30b, NKp30c (Delahaye et al. 2011; Neville and Campbell 1999). Ces trois isoformes diffèrent par la longueur de leur domaine intracytoplasmique mais aussi par leur fonction : NKp30a et NKp30b sont immunostimulantes en induisant la production de cytokines Th1 (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ ) au contraire de NKp30c qui induit un signal immunosuppresseur aboutissant à la sécrétion d'IL-10 (**Figure 9**, Delahaye et al. 2011). De plus, les isoformes NKp30a et NKp30b activent la voie canonique du NF- $\kappa$ B au contraire de NKp30c dont la signalisation passe par la MAP kinase p38. Il a été montré que le NKp30 jouait un rôle immunorégulateur en induisant la lyse des DC immatures tandis que les DC matures peuvent activer les cellules NK via ce même récepteur (Ferlazzo et al. 2002). NKp30 est capable de se lier aux protéines du tégument (pp65) du HCMV, induisant un signal inhibiteur en dissociant le domaine intracytoplasmique de NKp30 de la protéine adaptatrice CD3 $\zeta$  (Arnon et al. 2005). NKp30 est également capable de reconnaître BAG6 (Pogge von Strandmann et al. 2007). Cette protéine est exprimée dans le noyau mais peut être sécrétée via les exosomes et exprimée à la surface des cellules tumorales, des cellules stressées et des DC (Pogge von Strandmann et al. 2007; Simhadri et al. 2008). En plus des formes exosomale et membranaire activatrices, il existe une forme soluble inhibitrice (Simhadri et al. 2008). Un autre ligand activateur de NKp30 est la protéine transmembranaire B7-Homolog 6 (B7-H6) qui serait exprimée uniquement par les cellules tumorales et

les monocytes dans des conditions inflammatoires (Brandt et al. 2009; Matta et al. 2013). Cependant, ces monocytes vont aussi sécréter une forme soluble ou exosomale inhibitrice (Schlecker et al. 2014). Cette forme soluble a également été retrouvée dans le sérum de patients atteints de neuroblastome et la concentration de B7-H6 soluble a été corrélée à une diminution de l'expression de NKp30 sur les cellules NK infiltrant la tumeur ainsi qu'à une altération de leurs fonctions (Semeraro et al. 2015). De plus, la présence B7-H6 a été décrite à la surface de tumeurs ovariennes mais également sous forme soluble dans le liquide d'ascite et corrélée à une diminution de l'expression de NKp30 à la surface des cellules NK infiltrant la tumeur (Pesce et al. 2015). Un autre ligand, la Galectine 3, une *beta galactoside binding protein*, est exprimée sous forme soluble par les cellules tumorales et induit une inhibition des cellules NK (Wang et al. 2014). Il a été démontré que les isoformes de NKp30 avaient une valeur pronostique, en effet une expression majoritaire de l'isoforme NKp30c est associée à une diminution de la survie chez les patients atteints de GIST et de cancers bronchiques non à petites cellules (CBNPC) avancés (Delahaye et al. 2011; Fend et al. 2017). Le rôle des isoformes de NKp30 a également été démontré dans l'hépatite C (Mantovani et al. 2015), dans la grossesse (Shemesh et al. 2015) et dans le syndrome de Sjögren (Rusakiewicz et al. 2013). En revanche, bien que le rôle du récepteur NKp30 ait été démontré dans le mélanome, aucun impact des isoformes n'a été observé (Messaoudene et al. 2016).



**Figure 9:** Conséquences fonctionnelles de la liaison des isoformes de NKp30 avec ses ligands. Les isoformes du récepteurs NKp30 varient suivant leur domaine intracellulaire. Les isoformes NKp30a et NKp30b sont immunostimulatrices entraînant la sécrétion d'IFN $\gamma$  alors que l'isoforme NKp30c induit la production de la cytokine immunosuppressive IL-10 par la cellule NK.

### b. Le CD16

Le CD16 est un récepteur de faible affinité pour les fragments Fc des IgG1. Il est exprimé par les cellules NK (en très grande majorité par les CD56<sup>dim</sup>) (Perussia and Ravetch 1991), une sous-population de LT (Blank-Voorthuis et al. 1993) et des monocytes (Anderson et al. 1990). Ce récepteur possède un motif ITAM dans sa partie intracytoplasmique conduisant à la cytolyse et la production de cytokines après activation (Cassatella et al. 1989). Le récepteur CD16 est le récepteur par lequel l'ADCC des cellules NK est déclenché. De plus, le CD16 présente un polymorphisme qui affecte l'affinité du récepteur. Ainsi, l'efficacité de certains anticorps thérapeutiques a été corrélée à ce polymorphisme (Cartron et al. 2002).

### c. Le NKG2D

NKG2D appartient à la famille des récepteurs de type lectine, associé à une glycoprotéine transmembranaire de type I (Yabe et al. 1993). Son domaine intracytoplasmique court nécessite l'interaction avec une protéine adaptatrice pour être

fonctionnel : *DNAX-activation protein 10* (DAP10) chez l'Homme et *DNAX-activation protein 12* (DAP12) chez le souris (Diefenbach et al. 2002). NKG2D est exprimé par toutes les cellules NK chez l'Homme et la souris mais également sur les LT  $\gamma\delta$  humains, les LT CD8<sup>+</sup>, les NKT et sur une petite population de LT CD4<sup>+</sup> (Jamieson et al. 2002; Raulet 2003). L'expression de NKG2D peut être induite par différentes cytokines comme l'IL-2, l'IL-7, l'IL-15, l'IFN de type I (Marcais et al. 2013) ou bien diminuée par l'IL-21 et le TGF $\beta$  (Song et al. 2006).

NKG2D reconnaît deux familles de ligands. La première comprend les molécules MICA et MICB. Ce sont des molécules peu exprimées par les cellules saines mais dont l'expression est augmentée chez les cellules stressées ou tumorales (Bauer et al. 1999; Diefenbach et al. 2000; Guerra et al. 2008). La seconde famille comprend les protéines du HCMV, *UL16-binding proteins 1 à 6* (ULBP1-6). Ce sont des glycosylphosphatidylinositol (GPI) exprimées à la membrane (Raulet 2003). Il a été montré que des dommages à l'ADN entraînaient une expression des ligands de NKG2D indépendamment de p53 (Iannello et al. 2013). Néanmoins, la surexpression de p53 dans des cellules tumorales augmente l'expression de ULBP1 et ULBP2 à la surface de ces cellules (Li et al. 2011; Textor et al. 2011). Chez la souris, NKG2D reconnaît également le *Retinoic Acid Early Transcript 1* (RAE-1), une protéine membranaire non exprimée par les tissus sains (à l'exception de l'embryon) mais retrouvée à la surface des cellules cancéreuses (Diefenbach et al. 2003).

NKG2D est un récepteur jouant un rôle important dans l'élimination des cellules tumorales par les cellules NK. En effet, des souris déficientes en NKG2D présentent un risque plus important de développer des tumeurs (Guerra et al. 2008). De plus, le blocage de NKG2D augmente la sensibilité des souris aux sarcomes induits par des carcinogènes (Smyth et al. 2005). Ainsi, les cellules tumorales ont développé plusieurs stratégies pour échapper à la reconnaissance par NKG2D. Il a été montré qu'une expression continue de MICA par les cellules tumorales entraînait la diminution de l'expression de NKG2D (Oppenheim et al. 2005). De même, des ligands solubles sMICA et sMICB ont été identifiés et leur concentration a été corrélée à une baisse de la survie chez les patients atteints de carcinomes épidermoïdes (Tamaki et al. 2010). La présence de ULBP2 soluble (sULBP2) a également été associée à un mauvais pronostic clinique dans le mélanome (Paschen et al. 2009), la leucémie lymphoïde chronique (Nückel et al. 2010) et le cancer du poumon (Yamaguchi et al. 2012).

#### *d. Les KIR activateurs*

Les KIR sont une famille de glycoprotéines transmembranaires de type I exprimées par les cellules NK, les LT et les LT  $\gamma\delta$ . Les KIR sont classés selon leur nombre de domaines extracellulaires (2 ou 3) et la taille de leur domaine intracytoplasmique (long, L, ou court, S) ; ils sont dénommés KIRxDL/S. Les récepteurs possédant un domaine intracytoplasmique long contiennent un motif ITIM, induisant un signal inhibiteur (voir le paragraphe suivant sur les récepteurs inhibiteurs). Ceux possédant un domaine court ne contiennent pas de motifs ITIM et s'associent à la protéine adaptatrice DAP12 induisant l'activation des cellules NK (Campbell and Purdy 2011). Seul le KIR2DL4, parmi les KIR possédant un domaine intracytoplasmique long, induit une activation des cellules NK. Le seul ligand connu de ce récepteur est la molécule du CMH I, HLA-G. Son expression normale est limitée au trophoblaste, à l'épithélium thymique, aux kératinocytes de la cornée et aux précurseurs endothéliaux et érythroïdes (Carosella et al. 2015). Cependant, HLA-G a aussi été détectée dans différents cancers comme les mélanomes, les leucémies, les cancers du sein, du rein, des ovaires, des poumons et les cancers colorectaux (Rouas-Freiss et al. 2005). Les KIR reconnaissent des molécules du CMH I mais les KIR activateurs ont une plus faible affinité que les KIR inhibiteurs (Biassoni et al. 1996). Il a été démontré une corrélation entre l'augmentation de l'expression des gènes des KIR activateurs et une meilleure réponse immunitaire contre les pathogènes (Chen et al. 2006; Martin et al. 2002).

#### *e. DNAX accessory molecule-1 (DNAM-1)*

DNAM-1 (CD226) est une molécule d'adhésion appartenant à la superfamille des immunoglobulines. Il est exprimé par la majorité des cellules NK ainsi que par les LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>, les macrophages, les plaquettes et les DC chez l'Homme (Shibuya et al. 1996). DNAM-1 a besoin d'être associé à LFA-1 pour son fonctionnement (Shibuya et al. 1996). Les ligands identifiés de DNAM-1 sont le CD112 (nectin-2) et le CD155 (récepteur au poliovirus, PVR) (Bottino et al. 2003). Ils sont exprimés à la surface des monocytes, DC et des LT CD4<sup>+</sup> activés. Leur expression peut être induite par des infections virales entraînant la reconnaissance des cellules infectées par les lymphocytes NK (Magri et al. 2011; Pappworth, Wang, and Rowe 2007). Ces ligands peuvent également être exprimés par les cellules tumorales. DNAM-1 joue un rôle important dans la reconnaissance des cellules tumorales par les lymphocytes NK, en effet chez des souris déficientes pour DNAM-1, on observe une croissance tumorale



accélérée ainsi qu'une capacité amoindrie à rejeter les greffes tumorales (Gilfillan et al. 2008; Iguchi-Manaka et al. 2008). Les ligands CD112 et CD155 peuvent également se lier au *human T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains* (TIGIT), un récepteur exprimé par les cellules NK humaines mais transduisant un signal inhibiteur entraînant une diminution de la cytotoxicité des lymphocytes NK (Stanietsky et al. 2009). De plus, CD155 peut aussi se lier à CD96, un autre récepteur inhibiteur des cellules NK (Chan et al. 2014).

## B. Les récepteurs inhibiteurs

Les récepteurs inhibiteurs empêchent l'activation des cellules NK par reconnaissance avec les molécules du CMH I. Ces récepteurs empêchent donc la lyse des cellules saines exprimant le CMH I que les cellules transformées ou infectées expriment pas ou peu. Les récepteurs inhibiteurs principaux sont les KIR inhibiteurs (Moretta et al. 1996) et l'hétérodimère CD94/NKG2A (Braud et al. 1998; Sullivan et al. 2008).

### a. Les KIR inhibiteurs

Comme présenté dans le paragraphe précédent, les KIR sont divisés en deux familles suivant la longueur de leur domaine intracytoplasmique : les KIR-S avec un domaine court sont activateurs, les KIR-L avec un domaine long sont inhibiteurs. Les KIR-L possèdent des motifs ITIM sur leur queue cytoplasmique (Campbell and Purdy 2011). La majorité des KIR inhibiteurs reconnaissent les molécules du CMH I HLA-C. De plus ils présentent une plus grande affinité pour ces ligands que les KIR activateurs et lorsqu'ils sont co-exprimés, le signal inhibiteur est plus fort que le signal activateur (Vales-Gomez et al. 1998).

### b. CD94/NKG2A

CD94/NKG2 appartient à la famille des récepteurs de type lectine, ils sont exprimés à la fois chez l'Homme et la souris. CD94 est une chaîne invariante liée de manière covalente aux différents membres de la famille NKG2A (NKG2A, B, C, E ou H). Cet hétérodimère est exprimé par les cellules NK et une certaine population de LT (Gunturi, Berg, and Forman 2004). Alors que les membres NKG2C, E et H interagissent avec DAP12 pour transduire un signal activateur, NKG2A et B possèdent des motifs ITIM dans leur queue cytoplasmique transduisant un signal inhibiteur (Saunders et al. 2015). Les récepteurs de la famille CD94/NKG2 reconnaissent les molécules de la famille du CMH I HLA-E chez l'Homme. L'affinité des CD94/NKG2 inhibiteurs pour ce ligand est plus importante que celles des

activateurs (Saez-Borderias et al. 2009). Ainsi, de nombreux cancers présentent une surexpression de HLA-E permettant un échappement immunitaire (Kochan et al. 2013). De plus, une forme soluble a également été observée, inhibant l'activation ou induisant l'apoptose des cellules NK ou des LT CD8<sup>+</sup> (Laurent Derre et al. 2006; Guo et al. 2015).

### c. *Immunoglobulin-Like Transcript 2 (ILT2)*

ILT2, aussi appelé *Immunoglobulin-like receptor 1 (LIR1)* est un récepteur inhibiteur de la famille des ILT, le seul exprimé par les cellules NK. Il contient un motif ITIM et transduit un signal inhibiteur après interaction avec son ligand HLA-G (Borges et al. 1997; Navarro et al. 1999). De plus, ILT2 reconnaît également UL18, une molécule homologue du CMH I du HCMV. Cela engendre une inhibition des cellules NK exprimant ILT2 *in vitro* (Prod'homme et al. 2007).

## 5. Les cellules NK dans le microenvironnement tumoral

### A. Infiltrat immunitaire des cellules NK et mécanismes d'évasion

Plusieurs études ont démontré le rôle des lymphocytes NK dans le contrôle des tumeurs solides et des cancers hématologiques. Ainsi, il a été observé que les patients possédant des fonctions NK altérées dues au syndrome de Chedak-Higashi ou au syndrome lymphoprolifératif lié au chromosome X présentaient une plus grande incidence de cancers (Roder and Haliotis 1980; Sullivan et al. 1980). De plus, de nombreuses études sur des modèles murins de transplantation de tumeurs ou de tumeurs spontanées ont démontré que la déplétion des cellules NK favorisait la formation de tumeurs, la dissémination métastatique et entraînait une croissance tumorale plus importante (Gorelik et al. 1982; Ljunggren and Karre 1985; Seaman et al. 1987; Smyth, Crowe, and Godfrey 2001). D'autres études ont montré le rôle des récepteurs activateurs dans l'élimination des tumeurs par les cellules NK : des souris déficientes pour des récepteurs activateurs comme NKG2D, NKp46 ou DNAM-1 présentaient une croissance tumorale accélérée tandis qu'une surexpression de leurs ligands sur la tumeur provoquait un échappement de la tumeur (Glasner et al. 2012; Guerra et al. 2008; Halfteck et al. 2009).

Chez l'Homme, de nombreuses études translationnelles ont confirmé le rôle des lymphocytes NK dans la régulation de la croissance tumorale dans les cancers du poumon,

gastriques ou colorectaux : l'infiltration des cellules NK dans la tumeur a été corrélée avec un meilleur pronostic clinique (Coca et al. 1997; Gannon et al. 2009; Ishigami et al. 2000; Villegas et al. 2002). L'infiltrat de cellules NK est majoritairement composé de cellules CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>. Cela peut s'expliquer par leur survivabilité et capacité de prolifération plus élevée. Cependant le ratio cellules NK/cellules tumorales est souvent faible et les cellules NK ne sont pas directement en contact avec la tumeur mais s'accumulent dans le stroma péri-tumoral (Esendagli et al. 2008; Rusakiewicz et al. 2013; Sandel et al. 2005). Cette observation contraste avec le fait que de grandes concentrations de molécules adhésives (*Intercellular adhesion molecule-1*, ICAM-1 et *Vascular cell adhesion molecule-1*, VCAM-1) et chimiokines attirant les cellules NK ont été retrouvées dans les tissus tumoraux. Ainsi, un mécanisme encore inexplicé empêche la migration des cellules NK au cœur de la tumeur.

Les capacités fonctionnelles des cellules NK jouent bien évidemment un rôle dans leur capacité à contrôler la croissance tumorale. Ainsi, une étude prospective japonaise sur 11 ans a montré que l'incidence des cancers était négativement corrélée aux capacités cytotoxiques des lymphocytes NK (Imai et al. 2000). De plus, il a été observé que les haplotypes de NKG2D avaient un impact sur l'incidence des cancers : l'haplotype LNK1/LNK1, associé à une faible activité des cellules NK, a été corrélé à un risque plus élevé de développer un cancer que l'haplotype HNK1/HNK1, associé à une activité cytotoxique forte (Hayashi et al. 2006). De même, il a été rapporté que l'expression du récepteur inhibiteur CD94/NKG2A était augmentée dans les cancers du poumon et du sein (Carrega et al. 2008; Mamessier et al. 2011).

Du fait de l'importance des cellules NK dans l'élimination des cellules tumorales, des mécanismes d'évasion ont été mis en place par les tumeurs. Ainsi, il a été montré que les ligands de NKG2D pouvaient être clivés par des métalloprotéinases, inhibant les cellules NK dans le microenvironnement tumoral (Groh et al. 2002b; Salih, Rammensee, and Steinle 2002). Crane et collègues ont observé que l'expression de NKG2D Ligand (NKG2DL) pouvait être induite sur des cellules myéloïdes saines par des facteurs solubles sécrétés par la tumeur comme la lactate déshydrogénase (LDH) (Crane et al. 2014). Les cellules non tumorales présentes dans le microenvironnement tumoral, comme les Treg et les MDSC, peuvent également inhiber les cellules NK en sécrétant divers facteurs solubles comme la prostaglandine E2 (PGE2), l'IDO ou le TGF $\beta$  (Guillerey and Smyth 2016). Enfin, les conditions

physico-chimiques du microenvironnement tumoral jouent un rôle dans l'échappement tumoral (Balsamo et al. 2013). En effet il a été montré que l'hypoxie perturbait l'expression normale des NCR et du NKG2D. Ainsi, l'activité cytotoxique des cellules NK dans des conditions d'hypoxie est fortement diminuée (Sarkar et al. 2013). Cependant, les auteurs ont démontré qu'une incubation préalable des cellules NK avec de l'IL-2 pouvait prévenir les effets inhibiteurs de l'hypoxie.

Finalement, la présence de cellules NK elles-mêmes exerce une pression de sélection sur les cellules tumorales. Ainsi, O'Sullivan et collègues ont montré que des tumeurs générées chez des souris RAG<sup>-/-</sup> (donc sans système immunitaire adaptatif) et greffées dans des souris WT étaient moins immunogéniques que des tumeurs générées chez des souris RAG<sup>-/-</sup> ×  $\gamma$ c<sup>-/-</sup> (ne possédant aucun lymphocyte, incluant les cellules NK) (O'Sullivan et al. 2012). Cette *immunoediting* par les cellules NK a été également décrite chez l'Homme où l'on a pu observer que les patients atteints de cancer colorectaux présentaient au stade précoce des niveaux élevés de ligands au NKG2D mais que leur expression diminuait au fur et à mesure que la maladie progressait (McGilvray et al. 2009).

#### B. Immunothérapie des cancers ciblant les cellules NK

Surmonter l'obstacle du microenvironnement tumoral immunosuppresseur pour restaurer les fonctions cytotoxiques des cellules NK est une piste thérapeutique que de nombreux chercheurs explorent. En effet, ces dernières années, le domaine de l'immunothérapie anticancéreuse a connu un essor sans précédent avec la découverte des points de contrôle immunitaires (« *immune checkpoints* » en anglais) sur les LT, CTLA-4 et *Programmed cell death-1* (PD-1)/PD-L1, qui sont devenus la cible de nombreuses thérapies (Chau 2017; Guazzelli et al. 2017). Cependant l'intérêt se porte à nouveau sur les cellules NK pour leurs capacités lytiques indépendantes d'une quelconque spécificité antigénique. La faible capacité des lymphocytes NK à infiltrer les tumeurs solides peut expliquer leur efficacité à éliminer les métastases ou les cancers hématologiques (Benson et al. 2011; Ruggeri et al. 2002). Par ailleurs, les cellules NK seraient capables de lyser les cellules souches cancéreuses (Grossenbacher, Canter, and Murphy 2016).

Le transfert adoptif de cellules NK s'est montré prometteur pour certains cancers hématologiques. En effet, lors de la greffe de cellules souches hématopoïétiques chez ces

patients, les cellules NK sanguines réapparaissent très tôt et ont été corrélées avec un bon pronostic et l'efficacité anti-tumorale de ces lymphocytes NK a été démontrée dans différents cancers (Porrata et al. 2008; Rueff et al. 2014). Les cellules NK peuvent également être transférées de manière autologue : elles sont prélevées à partir du patient, cultivées *in vitro* avant d'être réinjectées dans le patient. Néanmoins cette méthode n'a pas élicité de réponses cliniques dans les cancers du rein, les mélanomes métastatiques et les cancers gastointestinaux car les cellules NK sont alors grandement inhibées par le CMH I exprimé par les cellules tumorales (Sakamoto et al. 2015). La préactivation *in vitro* des cellules NK par différentes cytokines (IL-2, IL-15, IL-18) a permis d'améliorer leur fonctions cytotoxiques (Parkhurst et al. 2011). Cependant la méthode de transfert allogénique, elle, sélectionne des cellules NK issues d'un donneur qui sont réinjectées dans le patient : les cellules NK ne sont alors plus inhibées par le CMH I, étant originaires d'un individu différent (Curti et al. 2011). Une autre méthode alternative est la génération de cellules NK modifiées exprimant un récepteur spécifique d'un antigène tumoral (CAR). Cette technologie a été initialement mise en place pour les lymphocytes T et a été adaptée récemment aux cellules NK. Pour le moment, ces CAR-NK ont été testées *in vitro* et chez la souris (Glienne et al. 2015; Klingemann 2014). Cette méthode est prometteuse car, contrairement aux CAR-LT, les CAR-NK n'ont qu'une faible durée de vie, limitant ainsi les risques d'autoimmunité ou de transformation maligne. De même la libération massive de cytokines par les CAR-LT peut s'avérer fatale alors que les CAR-NK se limitent majoritairement à une sécrétion d'IFN $\gamma$  et de GM-CSF. Cependant, la difficulté à isoler et cultiver de grand nombre de cellules NK à partir de sang ainsi que leur sensibilité à la cryopréservation limite le transfert adoptif de cellules NK. De plus, les techniques d'expansion *in vitro* peuvent induire une exhaustion des cellules cultivées (Klingemann 2015). Ainsi la lignée cellulaire NK-92, constituée de cellules NK transformées ayant une forte capacité cytotoxique, présente un intérêt particulier, ces cellules pouvant être cultivées facilement en de grandes quantités. Des cellules NK-92 non-modifiées ont été injectées avec succès chez des patients atteints de tumeurs résistantes aux précédents traitements, notamment dans le cancer du poumon (Tonn et al. 2013). De plus, des NK-92 modifiées exprimant un récepteur CAR ont été testées avec succès *in vitro* ou dans des modèles murins (Romanski et al. 2016; Zhang et al. 2016).

Une autre stratégie consiste à modifier le microenvironnement tumoral en injectant des cytokines activatrices des cellules NK ou en les préincubant en leur présence. Ainsi, l'injection d'IL-15, une cytokine stimulatrice des cellules NK, après une greffe de cellules souches hématopoïétiques chez des patients atteints de lymphomes non-Hodgkiniens a été associée à une meilleure survie (Porrata et al. 2010). La protéine de fusion superagoniste IL-15/IL-15R $\alpha$ -Sushi-Fc a également montré une activité supérieure à l'IL-15 dans sa fonction stimulatrice des cellules NK et est actuellement rentrée dans un essai clinique (Kim et al. 2016). Des inhibiteurs de molécules inhibitrices des cellules NK ont également été développés, notamment contre le TGF $\beta$  ainsi qu'un Ac antagoniste du récepteur à l'adénosine A<sub>2A</sub> (Maier et al. 2015; Mittal et al. 2014).

L'utilisation d'anticorps contre des cibles spécifiques des tumeurs entraîne également l'activation des cellules NK, via le récepteur au fragment Fc des IgG1 CD16. Ainsi les Ac anti-HER2, anti-*epidermal growth factor receptor* (EGFR) ou l'anti-CD20 ont démontré leur efficacité clinique basée sur deux mécanismes : l'induction de l'apoptose des cellules tumorales contre lesquelles ils sont dirigés et la reconnaissance par les cellules immunitaires, dont les lymphocytes NK, de leur fragment Fc induisant l'ADCC (Bakema and van Egmond 2014). Pour améliorer l'effet de ces anticorps, des anticorps bispécifiques ont été développés. Ainsi, des anticorps ciblant à la fois les cellules tumorales et les cellules NK ont été testés chez des patients atteints de lymphomes de Hodgkin à la fin des années 90 (Hartmann et al. 1997). Ces constructions ont été améliorées avec les anticorps trispécifiques, comme par exemple l'Ac ciblant à la fois le CD33, le CD16 et incorporant l'IL-15, se révélant plus efficace que l'anticorps bispécifique IL-33/IL-15 (Vallera et al. 2016). D'autres anticorps bispécifiques ciblant plus spécifiquement les cellules NK ont également été développés comme un anti-NKG2D/anti-CD20 dont l'efficacité a été démontrée *in vitro* (Kellner et al. 2012).

De manière similaire au blocage des points de contrôle immunitaires sur les lymphocytes T pour les activer, le ciblage des récepteurs KIR sur les cellules NK représente une stratégie thérapeutique prometteuse. L'IPH2101 est un Ac humain se liant au KIR2DL1, KIR2DL2 et KIR2DL3. Son activité a été prouvée avec une augmentation de l'activité cytotoxique des cellules NK (Benson et al. 2012; Vey et al. 2012), cependant son efficacité clinique n'a pas été démontrée (Korde et al. 2014). Néanmoins, cet anticorps présente un

grand intérêt notamment en combinaison avec d'autres agents thérapeutiques comme un Ac anti-CD20 ou le lénalidomide (une molécule immunomodulatrice) (Benson et al. 2011; Kohrt et al. 2014). D'autres anticorps ciblant des récepteurs inhibiteurs des cellules NK ont été développés, notamment un anti-CD94/NKG2A (McWilliams et al. 2016), un anti-CD96 (Blake et al. 2016) et un anti-KIR3DL2 (Marie-Cardine et al. 2014). Enfin, le blocage de CTLA-4 et de PD-1, exprimés majoritairement par les LT mais également par les cellules NK, a démontré son efficacité à activer les LT néanmoins, leur efficacité passe sans aucun doute également par leur action sur les cellules NK: le CTLA-4 régulant négativement la sécrétion d'IFN $\gamma$  par les lymphocytes NK par exemple (Stojanovic et al. 2014). Le ciblage simultané de NKG2A et de PD-1 montre également des résultats encourageants (Sola et al. 2016).

Il apparait que chaque stratégie thérapeutique ciblant les cellules NK et son microenvironnement possède ses avantages et ses limites. Ainsi, une approche combinatoire des différentes stratégies ciblant les lymphocytes NK ou se basant sur les cellules NK mais également des thérapies anti-tumorales conventionnelles semble des plus prometteuses.

Les cellules NK présentent donc des mécanismes d'élimination des cellules tumorales inédits. Ainsi, leur rôle déterminant dans différents cancers a été démontré notamment dans les GIST. La partie suivante se focalisera donc sur ces tumeurs et les stratégies immunothérapeutiques mises en place pour leurs traitements.

### III. [Les tumeurs stromales gastrointestinales \(GIST\)](#)

#### 1. Caractéristiques des GIST

Les GIST ont été décrits pour la première fois par Mazur et Clark en 1983. Ils ont alors observé des tumeurs non-épithéliales, ne présentant pas de caractéristiques de l'ultrastructure des cellules des muscles lisses et n'exprimant pas de marqueurs histologiques des cellules de Schwann (ou neurolemmocytes, des cellules gliales assurant la myélinisation des axones du système nerveux périphérique) (Mazur and Clark 1983). Les GIST sont des sarcomes d'origine mésenchymateuse pouvant toucher l'ensemble du tube digestif et représentant 18% de tous les sarcomes (Cassier and Blay 2011). Les GIST représentent les tumeurs mésenchymateuses du tube digestif les plus courantes, environ 5000 cas sont diagnostiqués par an aux Etats-Unis (Barnett, Corless, and Heinrich 2013). Ils

sont issus des cellules de Cajal, les cellules responsables du mouvement péristaltique du tube digestif. La grande majorité des GIST se développent dans l'estomac (60%) mais ils peuvent aussi se retrouver au niveau du petit intestin (25%), du côlon et du rectum (10%) ainsi que de l'œsophage, de l'épiploon, du mésentère et du rétropéritoine (<1%). Les GIST forment principalement des métastases dans le foie et les membranes abdominales et plus rarement dans les ganglions lymphatiques. Lors du diagnostic, 50% des patients sont métastatiques ou ne peuvent être opérés (Pierie et al. 2001). L'âge moyen au diagnostic est de 58 ans. Les GIST sont généralement asymptomatiques et sont détectés accidentellement lors d'exams pour d'autres pathologies. Seulement 10 à 20 cas par million présentent une manifestation clinique (Nilsson et al. 2005).

Les cellules tumorales des GIST ont un profil d'expression génique les différenciant des autres sarcomes de tissus mous. En effet, elles présentent des caractéristiques immunophénotypiques et ultrastructurelles intermédiaires entre les muscles lisses et les neurones. Les GIST présentent à 95% des cellules exprimant la protéine c-Kit (CD117) à leur surface (Lasota and Miettinen 2006), ce qui en fait un excellent biomarqueur pour le diagnostic (Rubin et al. 2001).

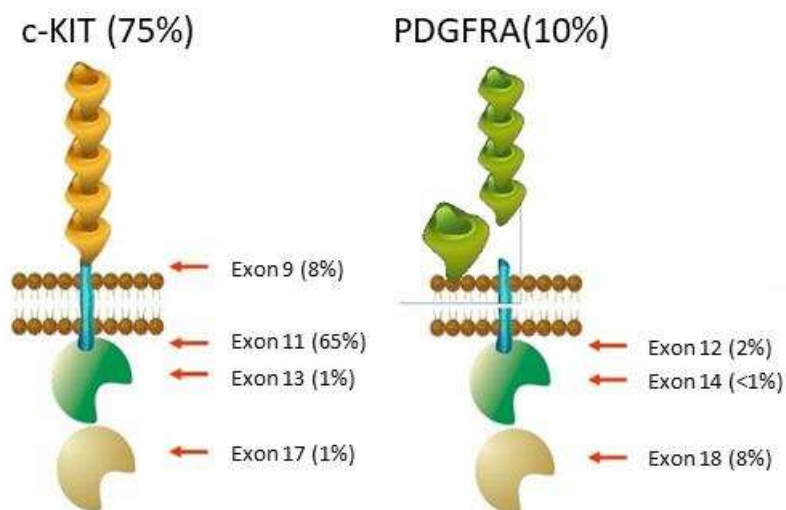
CD117 est un récepteur tyrosine kinase se liant au facteur de croissance SCF (Philo et al. 1996) et induisant la prolifération. C'est un proto-oncogène situé sur le chromosome 4q11-q12 qui joue un rôle critique pour les cellules de Cajal ainsi que dans l'hématopoïèse, la mélanogenèse et la gamétogenèse (Linnekin 1999). Son activation est également essentielle pour le développement de la majorité des GIST. En effet, 75% des GIST présentent une mutation de CD117 (Emile et al. 2012) induisant une activation constitutive du récepteur qui permet la prolifération, une résistance à l'apoptose et une perte d'adhésion de la cellule tumorale. CD117 peut être muté à plusieurs endroits (Fletcher and Rubin 2007; Lasota et al. 2008) (**Figure 8**) :

- Les mutations dans l'exon 11 (delW557 et/ou delK558, ou mutation non-sens) représentent les mutations les plus fréquentes (65%) et sont associées à une plus grande probabilité de rechute ainsi qu'à un mauvais pronostic clinique.
- La mutation de l'exon 9 est présente dans 8% des cas, est associée à des GIST agressifs avec un risque de progression plus important que ceux muté dans l'exon 11.



- Les mutations des exons 13 et 17 sont beaucoup plus rares et sont associées à des GIST très agressifs.

Cependant 10% des patients ne présentent pas de mutation de c-Kit mais d'un autre récepteur tyrosine kinase : le *platelet-derived growth factor receptor alpha* (PDGFRA), ces mutations étant mutuellement exclusives. (**Figure 10**) (Corless, Fletcher, and Heinrich 2004). Ces GIST n'expriment pas ou peu le CD117 (Lasota and Miettinen 2006). Enfin, 15% des patients GIST ne présentent pas de mutations de c-KIT ni de PDGFRA, on les qualifie de GIST sauvages (*wild type, WT*) (Lasota and Miettinen 2006).



**Figure 10:** les mutations de c-Kit et de PDGFRA dans le GIST. La majorité des GIST présentent une mutation du récepteur c-KIT (75%), le reste exprime une mutation de PDGFRA (10%) ou pas de mutation (5%). Plus de la moitié des GIST sont mutés dans l'exon 11 de c-KIT (65%). Les autres mutations les plus fréquentes affectant l'exon 9 de c-KIT ou l'exon 18 de PDGFRA (8%). Des mutations des exons 13 et 17 peuvent également survenir dans c-KIT (1%) alors que l'exon 12 et l'exon 14 de PDGFRA peuvent aussi être mutés (respectivement 2% et <1%). Modifiée d'après Yan et al. 2015.

Afin de prédire au mieux les risques de rechute, plusieurs classifications des GIST ont été créées. La première a été établie par le *National Institutes of Health* (NIH) aux Etats-Unis en 2001 et se basait sur la taille de la tumeur et l'index mitotique (nombre de cellules tumorales en division par champ microscopique) (Pierie et al. 2001). En 2006, afin d'intégrer le risque lié à la localisation de la tumeur, Miettinen et collègues ont créé la classification de l'*Armed Forces Institute of Pathology* (AFIP) (Miettinen and Lasota 2006) (**Figure 11**). Finalement, en 2010, l'*American Joint Committee on Cancer* (AJCC) a développé une nouvelle

classification des GIST dans le but d'intégrer la classification AFIP avec celle TNM (tumeur, ganglions lymphatiques (*lymph nodes*) et métastases : le système de classification international des cancers créé par l'Union internationale pour le contrôle du cancer (IUCC) (Edge and Compton 2010). Ainsi la nouvelle classification considère que les patients ont un faible risque de rechute lorsque la probabilité de rechute à 5 ans n'excède pas 10%, un risque moyen entre 10 et 30% et un risque élevé au-delà (Gronchi 2013).

Groupe	Index mitotique	Taille	GIST Gastrique	GIST Jejunum/Iléon	GIST Duodénal	GIST Rectal
1	≤5 par 50 champ	≤2cm	0%	0%	0%	0%
2		>2cm à ≤5 cm	1.9%	4.3%	8.3%	8.5%
3a		>5 cm à ≤10 cm	3.6%	24%	34%	57%
3b		>10 cm	12%	52%		
4	>5 par 50 champ	≤2cm	0% faible nombre de cas	50%	Nombre de cas insuffisant	54%
5		>2cm à ≤5 cm	16%	73%		50%
6a		>5 cm à ≤10 cm	55%	85%	86%	71%
6b		>10 cm	86%	90%		
Risque métastatique	Aucun	Très faible	Faible	Modéré	Important	

**Figure 11:** Classification Miettinen du risque de progression des GIST selon leur localisation. Cette classification prend en compte le localisation de la tumeur, sa taille ainsi que son index mitotique pour définir le risque métastatique. Adaptée de Miettinen and Lasota 2006.

## 2. Les traitements des GIST

Le traitement de première ligne pour les GIST primaires est la résection chirurgicale, réalisée dans environ 70% des patients. Pour les patients non-opérables ou dont la maladie est trop avancée, les solutions thérapeutiques étaient limitées avant 2001 et se basaient sur la chimiothérapie notamment par la doxorubicine, l'ifosfamide ou le temozolomide, avec un taux de réponse compris entre 5% et 10% (Pidhorecky et al. 2000). En 2001, l'imatinib mesylate (IM) s'est avéré être un puissant inhibiteur de l'autophosphorylation du récepteur tyrosine kinase c-KIT, améliorant drastiquement la survie des patients GIST (Demetri 2002; van Oosterom et al. 2001). L'IM est un inhibiteur des tyrosine kinases (TKI) développé initialement pour les leucémies myéloïdes chroniques et ciblant l'activité du récepteur tyrosine kinase ABL (Schindler et al. 2000). Cependant, il a été observé que l'IM inhibait également spécifiquement c-KIT et PDGFRA en rentrant en compétition pour leur site de liaison à l'adénosine triphosphate (ATP) (Heinrich et al. 2002). La Haute Autorité de Santé a approuvé l'utilisation de l'IM pour le traitement des GIST en 2002 et c'est encore le

traitement de référence à ce jour. L'IM est aujourd'hui prescrit pour les patients dont la tumeur est non-résécable et/ou métastatique. La réponse à l'IM varie suivant les mutations de c-KIT et PDGFRA. Les patients avec une mutation de l'exon 11 de c-KIT présentent une meilleure réponse, une meilleure survie ainsi qu'un risque réduit de progression que les patients atteints de mutation à l'exon 9 de c-KIT ou les patients WT (Anon 2010).

L'un des freins majeurs au traitement par l'IM est l'apparition de mutations secondaires chez 60,3% des patients, induisant une résistance à l'IM, dans les 12 à 36 mois suivant le début du traitement, majoritairement sur l'exon 17 (54,5%) ou 13 (38,3%) de c-KIT (Lee et al. 2013). De plus, Lee et collègues ont observé que chez les patients mutés c-KIT, les patients porteurs d'une mutation sur l'exon 9 acquéraient plus fréquemment une résistance que les patients mutés sur l'exon 11 (respectivement 25,9% et 12,7%) (Lee et al. 2013). Il a été montré qu'une administration discontinue du traitement ne prévenait pas l'apparition de la résistance mais au contraire favorisait une progression de la maladie chez les patients atteints de GIST avancés (Blay et al. 2007; Blay, Perol, and Le Cesne 2012). Ainsi, de nouvelles approches ont été étudiées, seules ou en combinaison avec l'IM, basées sur l'immunothérapie via par exemple des Ac anti-inhibiteurs des points de contrôle immunitaires (anti-PD-1/PD-L1).

### 3. Le rôle du système immunitaire dans le GIST

Les GIST sont des tumeurs infiltrées par différentes cellules du système immunitaire. Les DC représentent la population la plus importante chez les patients GIST non-traités, suivis des LT et des monocytes (Cameron et al. 2014). L'infiltrat immunitaire change significativement en réponse à l'IM. En effet, les GIST primaires et métastatiques traités à l'IM sont majoritairement infiltrés par des TAM puis par des lymphocytes T CD3<sup>+</sup> (van Dongen et al. 2010). Les cellules NK, les neutrophiles, les DC, les NKT, les LB et les LT  $\gamma\delta$  sont également présents mais dans une moindre mesure. Les TAM sont composés de macrophages M1 et M2. Alors que les M1 ont une fonction anti-tumorale de par leur sécrétion de cytokines pro-inflammatoires activant les LT, les M2, qui expriment le récepteur « éboueur » CD163, ont une action pro-tumorale en inhibant la polarisation Th1 et en stimulant l'angiogenèse. Van Dongen et collègues ont montré que les macrophages M2 représentaient la population majoritaire des TAM et que leur nombre était deux fois plus

élevé dans les GIST métastatiques que dans les GIST primaires. De plus, le nombre de Treg est corrélé avec la quantité de macrophages M2, favorisant un microenvironnement tumoral immunosuppresseur. Les auteurs ont également observé une diminution de l'expression de molécules du CMH I à la surface des cellules tumorales. Ce mécanisme favorise l'échappement des cellules tumorales aux LT mais les rend en contrepartie sensibles à la lyse par les cellules NK. Cependant, Rusakiewicz et collègues ont montré que l'importance de l'infiltrat LT CD3<sup>+</sup> était inversement corrélée à la taille de la tumeur et impactait positivement le pronostic des patients. De plus, ils ont observé que le nombre de cellules NK infiltrant les GIST était associé avec une prolifération réduite des cellules tumorales, une localisation gastrique, un taux de rechute faible et une meilleure survie (Rusakiewicz et al. 2013). Cependant, dans les GIST non-traités, les cellules NK ne sont pas présentes au sein de la tumeur mais en périphérie dans le stroma péri-tumoral (Delahaye et al. 2011). Néanmoins le traitement à l'IM induit une relocalisation des cellules NK dans le cœur de la tumeur. Delahaye et collègues ont également démontré que l'isoforme immunosuppressive NKp30C du récepteur NKp30 était préférentiellement exprimée par les cellules NK du sang périphérique des patients GIST et était associée à une baisse de la survie, au contraire des isoformes immunostimulantes NKp30A et NKp30B. Ils ont également observé une diminution du récepteur NKp30 à la surface des cellules NK infiltrant la tumeur par rapport aux cellules NK du compartiment sanguin.

Même des patients GIST présentant une faible expression de c-KIT peuvent développer une réponse durable à l'IM, ce qui suggère que l'IM n'agirait pas uniquement sur les cellules tumorales. L'effet « hors cible » de l'IM a été démontré par Borg et collègues qui ont observé que des lignées tumorales résistantes à l'IM *in vitro* devenaient sensibles *in vivo* par un mécanisme NK-dépendant (Borg et al. 2004). En effet, les DC expriment également c-KIT à leur surface et en l'inhibant, l'IM promeut une interaction cellules NK-DC qui conduit à la stimulation de ces cellules NK et à la sécrétion d'IFN $\gamma$ . Ainsi, dans 49% des patients GIST traités par IM enrôlés dans cette étude, les cellules NK présentaient une augmentation de leur fonction cytotoxique. Cette activation des cellules NK par l'IM est corrélée à une meilleure survie. Ces observations ont été confirmées par Menard et collègues qui ont de plus identifié la sécrétion d'IFN $\gamma$  comme le seul marqueur indépendant prédisant la survie à long terme, au contraire du profil c-KIT, de la taille et de la localisation de la tumeur (Menard

et al. 2009). L'IM agit également sur d'autres cellules du système immunitaire. Dans une autre étude dans un modèle de GIST murins, les auteurs ont montré que l'IM augmentait la fréquence, l'activation et la prolifération des LT CD8<sup>+</sup> intratumoraux ainsi que l'apoptose des Treg en diminuant la production d'IDO, un métabolite immunosuppresseur induisant la différenciation des Treg (Balachandran et al. 2011). Ces résultats font écho aux travaux de Rusakiewicz et collègues qui ont montré que l'accumulation de Treg et la perte de cellules NK étaient des marqueurs prédictifs négatifs de la réponse à l'IM (Rusakiewicz et al. 2013). Cependant, le rôle des cellules NK dans le GIST a été remis en cause par les travaux de Balachandran et collègues qui ont montré que la déplétion en LT CD4<sup>+</sup> ou en cellules NK n'impactait pas la croissance tumorale durant le traitement à l'IM dans un modèle de GIST murin (Balachandran et al. 2011). Ces résultats pourraient s'expliquer par le fait que le rôle des cellules NK dans le GIST a été démontré via son récepteur activateur NKp30 et plus particulièrement de ses différentes isoformes. Or le récepteur NKp30 n'est pas exprimé chez la souris, ainsi le rôle des cellules NK s'en trouve s'en doute amoindri. Cette même équipe a également démontré le rôle négatif des neutrophiles infiltrant les tumeurs sur la survie des patients GIST non-traités (Perez et al. 2013).

#### 4. L'immunothérapie dans les GIST

Le rôle du système immunitaire dans la réponse à l'IM démontre l'important potentiel thérapeutique de l'immunothérapie dans le traitement des GIST. Balachandran et collègues ont étudié l'effet de la combinaison d'un anti-CTLA-4 avec l'IM dans un modèle de GIST murin et ont observé une diminution significative des tumeurs comparée avec chacun des traitements seuls (Balachandran et al. 2011). Aucun changement dans le nombre de LT CD8<sup>+</sup> ou CD4<sup>+</sup> n'a été observé, cependant les LT CD8<sup>+</sup> intratumoraux présentaient une sécrétion d'IFN $\gamma$  accrue qui pourrait expliquer l'effet bénéfique de la thérapie combinée.

L'expression de PD-L1 a également été étudiée dans le GIST et a révélé une expression hétérogène à la surface des cellules tumorales. Néanmoins, les auteurs de cette étude ont pu observer qu'une faible expression de PD-L1 était corrélée avec un risque plus élevé de développement de métastases (Bertucci et al. 2015). Récemment, il a été montré que les récepteurs inhibiteurs des points de contrôle immunitaires PD1, *lymphocyte activation gene 3* (LAG3) et *T-cel immunoglobulin mucin 3* (TIM3) étaient surexprimés dans

les TILs des GIST par rapport aux LT sanguins. De plus, aussi bien chez l'Homme que dans un modèle de GIST murin, il a été observé que l'IM réduisait l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales et que la combinaison de l'IM et le blocage de PD-1 et PD-L1 *in vivo* améliorait les capacités anti-tumorales des LT (Seifert et al. 2017). Ces résultats montrent que cibler l'axe PD-1/PD-L1 dans le GIST pourrait être une stratégie thérapeutique afin d'améliorer l'efficacité de l'IM. Dans une autre étude, les auteurs ont observé l'expression du récepteur inhibiteur TIM3 à la surface des cellules NK dans 75% des GIST étudiés tandis que son ligand, galectine-9, est exprimé par plus de 68% des cellules tumorales des GIST (Komita et al. 2015).

Une autre approche pour l'immunothérapie des GIST serait l'injection de cytokines. Ainsi dans une étude clinique publiée en 2012, l'injection d'interféron  $\alpha$  (IFN $\alpha$ ), une cytokine promotrice des LT Th1, en combinaison avec l'IM chez des patients GIST a montré une remarquable efficacité avec un taux de réponse complète de 100% des huit patients inclus (Chen et al. 2012). De plus, chez ces patients, la sécrétion d'IFN $\gamma$  était augmentée de manière significative après quatre semaines de traitement.

L'inhibition du récepteur c-KIT par un anticorps neutralisant anti-c-KIT a également été étudiée. L'anticorps anti-c-KIT SR1 a démontré son efficacité à inhiber la croissance de GIST sensibles à l'IM mais également de GIST résistants à l'IM dans des modèles murins de xénogreffe. Ainsi, SR1 diminuait l'expression de c-KIT en induisant son internalisation et augmentait la phagocytose par les macrophages (Edris et al. 2013). Le fait que SR1 inhibe la croissance de tumeurs GIST indépendamment de leur sensibilité à l'IM permet d'envisager son utilisation chez des patients GIST ayant développé une résistance à l'IM.

Enfin, l'utilisation de LT à récepteur antigénique chimérique (CAR-LT) est également une option thérapeutique prometteuse pour le traitement des GIST. Les CAR-LT sont des LT dont le *T cell receptor* (TCR), a été modifié génétiquement pour reconnaître un antigène tumoral spécifique. Ainsi Katz et collègues ont produit des CAR-LT anti-c-KIT. Ils ont démontré que ces CAR-LT étaient capables de produire de l'IFN $\gamma$  et de lyser des cellules tumorales de GIST *in vitro*. Dans un modèle murin de xénogreffe de GIST, ils ont montré que le traitement par CAR-LT anti-c-KIT entraînait une réduction significative de la croissance tumorale (Katz et al. 2013). D'autres antigènes pourraient être utilisés pour cibler les GIST comme les *cancers testis antigens* (CTA), des antigènes normalement exprimés par les

cellules germinales mais qui peuvent être également exprimés par les cellules tumorales. Ainsi, les CTA ont été détectés dans 10% à 27% des GIST et leur expression a été associée à un risque plus élevé de rechute, une taille de tumeur plus importante et une réponse plus faible au traitement par l'IM (Perez et al. 2011).

L'imatinib mesylate a révolutionné le traitement des GIST en améliorant considérablement la survie des patients. Cependant, des mécanismes de résistance peuvent apparaître, rendant les tumeurs insensibles à l'IM. Les études rapportées dans ce paragraphe montrent le fort potentiel de l'immunothérapie dans le traitement des GIST, en permettant notamment de surmonter ces mécanismes de résistance. Les cellules NK jouent un rôle majeur dans le GIST et particulièrement le récepteur NKp30 et ses isoformes. Cependant, il apparaît que les cellules NK sont majoritairement concentrées à la périphérie des GIST et sont inhibées par le microenvironnement tumoral. Comprendre les mécanismes de cette inhibition apparaît donc primordial pour contourner ses mécanismes.

# Objectifs de thèse

Malgré les progrès des traitements anti-tumoraux de ces dernières années, plus de 60% des patients atteints de GIST développent une résistance à l'IM et rechutent (Lee et al. 2013). Pour cette raison, les GIST avancés présentent toujours majoritairement un pronostic clinique défavorable. L'équipe a précédemment démontré l'importance de l'infiltrat immunitaire et plus spécifiquement des cellules NK dans la survie des patients GIST (Rusakiewicz, Semeraro, et al. 2013) et également montré que l'isoforme immunosuppressive C du récepteur NKp30 était prédictive du pronostic clinique des GIST (Delahaye et al. 2011).

Ainsi, dans un premier projet, notre but a été d'étudier la valeur pronostique du récepteur NKp30 dans la réponse à l'IM. Nous avons mesuré son expression dans deux cohortes indépendantes de patients métastatiques GIST. Nous avons également cherché à déterminer l'impact des ligands solubles de NKp30, sB7-H6 et sBAG6 sur la survie des patients et la réponse à l'IM. Les résultats de ce projet sont présentés dans l'**article 1**.

L'immunothérapie anti-cancéreuse a connu récemment des avancées majeures avec la mise au point des anticorps bloquant les inhibiteurs des points de contrôle immunitaires : l'anti-CTLA-4, l'anti-PD-1 et l'anti-PD-L1. Cependant, les patients GIST ne bénéficient toujours pas de ces traitements malgré des études menées dans des modèles murins (Balachandran et al. 2011; Seifert et al. 2017). De plus la majorité des articles portant sur ces anticorps bloquants décrivent leur action sur les LT. D'autres études ont décrit des contrôles immunitaires chez les cellules NK à travers les récepteurs CD96, TIGIT ou CIS (Blake et al. 2016; Putz et al. 2017; Stanietsky et al. 2009), ces mécanismes ne suffisent cependant pas à expliquer l'anergie des cellules NK dans le microenvironnement tumoral.

Ainsi, dans un second projet nous avons cherché à identifier de nouveaux mécanismes inhibiteurs propres aux cellules NK infiltrant les tumeurs afin d'établir de nouvelles cibles thérapeutiques pour l'immunothérapie anti-cancéreuse. Pour cela nous avons réalisé un *microarray* sur des GIST afin d'identifier les gènes associés à un mauvais



pronostic clinique ou un mauvais profil NKp30. Les résultats de ce projet sont présentés dans **l'article 2**.

Ces résultats permettent d'approfondir la compréhension des mécanismes d'inhibition des cellules NK par le microenvironnement tumoral et, à plus long terme, permettront d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour contourner ces mécanismes.

# Article 1: NKp30 isoforms and NKp30 ligands are predictive biomarkers of response to imatinib mesylate in metastatic GIST patients

Dans cet article, nous avons cherché à déterminer de nouveaux biomarqueurs de la réponse à l'imatinib mesylate (IM) dans les GIST métastatiques en lien avec l'interaction du récepteur NKp30 et de ses ligands. L'équipe a précédemment démontré la valeur prédictive de l'infiltrat des cellules NK dans la survie des patients GIST et que l'expression de certains isoformes du récepteur NKp30 est fortement corrélée à la survie globale des patients GIST métastatiques. Cependant, l'expression hétérogène des isoformes au sein même de la population NK d'un patient GIST ou volontaire sain (VS) nous a amené à concevoir une nouvelle méthode pour définir le profil NKp30 des patients. Nous avons déterminé le profil NKp30 en prenant en compte l'expression relative des trois isoformes en utilisant la formule du « delta » :  $\Delta\text{NKp30}_x\text{NKp30}_y = \text{Seuil de cycle (Ct) NKp30}_y - \text{Ct NKp30}_x$ . Nous avons pu vérifier que les profils ainsi déterminés étaient stables au cours du temps. Nous avons alors observé que  $\Delta\text{BC}$  est significativement réduit dans les GIST métastatiques par rapport aux VS. De plus, le profil NKp30 des patients, défini suivant la valeur médiane de  $\Delta\text{BC}$  sur la cohorte, est corrélé à la survie globale : les patients  $\Delta\text{BC}^{\text{low}}$  présentent une survie globale plus faible que les patients  $\Delta\text{BC}^{\text{high}}$  dans les deux cohortes utilisées indépendamment du statut de la mutation c-KIT des patients.

Nous avons par la suite étudié l'influence des isoformes NKp30 sur l'environnement cytokinique de la tumeur. Nous avons observé une sécrétion préférentielle de  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IFN}\gamma$  et IL-12p40 par les cellules NK  $\Delta\text{BC}^{\text{high}}$  péri-tumorales au contraire des  $\Delta\text{BC}^{\text{low}}$  qui présentaient un taux élevé de cytokines inflammatoires comme l'IL-1 $\beta$  ou l'IL-8 ainsi que de la cytokine anti-inflammatoire IL-10. De plus, il est apparu que les patients de mauvais pronostic clinique ( $\Delta\text{BC}^{\text{low}}$ ) présentaient une plus forte concentration de  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IFN}\gamma$  et IL-12p40 dans leur zone péri-tumorale que les patients de bon pronostic clinique. Les cellules NK influenceraient donc le microenvironnement de la zone péri-tumorale.

Afin de déterminer la contribution de chaque isoforme de NKp30 au mauvais pronostic associé au  $\Delta BC^{\text{low}}$ , nous avons mesuré l'expression relative de chaque isoforme dans les cellules NK du sang des patients GIST par rapport aux VS. Ainsi, contrairement aux VS, la diminution de la valeur du  $\Delta BC$  des GIST est due à une diminution de l'expression de l'isoforme NKp30C. Plus précisément, les patients GIST présentent une diminution de l'expression globale des trois isoformes en comparaison avec les VS. De plus, un taux élevé d'expression globale de chaque isoforme est corrélé à une meilleure survie sans évènement mais également survie globale des patients GIST métastatiques traités à l'IM, indépendamment du statut de la mutation c-KIT.

Nous avons ensuite mesuré le taux sérique des deux ligands solubles de NKp30, sB7-H6 et sBAG6 dans les patients GIST métastatiques à la date du prélèvement et après traitement à l'IM. Le sB7-H6 est abondant dans les patients avant chirurgie et plus particulièrement dans les patients métastatiques et diminuait après traitement à l'IM. Seul le sBAG6 était corrélée négativement avec le taux d'expression des trois isoformes de NKp30 à la fois dans les GIST métastatiques et localisés. Néanmoins, le taux de sB7-H6 avant traitement à l'IM était corrélé à la survie sans évènement des GIST métastatiques, alors que la détection de sBAG6 durant le traitement à l'IM était corrélée à un mauvais pronostic clinique. La présence des deux ligands n'a été détectée que dans de très rares cas et l'absence de ligands soluble s'est révélée de bon pronostic pour la réponse à l'IM.

Enfin, nous avons testé différentes molécules pour réactiver *in vitro* les TILs issus des GIST. Ainsi, l'IFN $\alpha$  a induit une augmentation de la sécrétion d'IFN $\gamma$  par les cellules NK, de même que l'anti-TRAIL qui active également les LT CD4 $^+$ . De plus, la prolifération des LT CD4 $^+$  et des LT CD8 $^+$  était augmentée après traitement par l'Ac neutralisant anti-FasL, et les Ac anti-TRAIL et anti-IL-10.

Nos travaux, pour lesquels j'ai apporté ma contribution en particulier pour la détermination des profils NKp30, montrent donc que le taux d'expression des différentes isoformes du NKp30 ainsi que la concentration sérique des ligands solubles de NKp30 sB7-H6 et sBAG6 s'établissent comme de nouveaux biomarqueurs prédictifs de la réponse à l'IM des patients GIST métastatiques.

ORIGINAL RESEARCH

## NKp30 isoforms and NKp30 ligands are predictive biomarkers of response to imatinib mesylate in metastatic GIST patients

Sylvie Rusakiewicz<sup>a,b,c</sup>, Aurélie Perier<sup>a,b</sup>, Michaela Semeraro<sup>a,b,d</sup>, Jonathan M. Pitt<sup>a,b</sup>, Elke Pogge von Strandmann<sup>e</sup>, Katrin S. Reiners<sup>e</sup>, Sandrine Aspeslagh<sup>a,b,f</sup>, Christelle Pipérogroul<sup>g</sup>, Frédéric Vély<sup>g,h,i</sup>, Alexandre Ivagnes<sup>a,b</sup>, Sarah Jegou<sup>a,b</sup>, Niels Halama<sup>j,k</sup>, Loïc Chaigneau<sup>l</sup>, Pierre Validire<sup>m,n</sup>, Christos Christidis<sup>n,o</sup>, Thierry Perniceni<sup>n</sup>, Bruno Landi<sup>p</sup>, Anne Berger<sup>q</sup>, Nicolas Isambert<sup>r</sup>, Julien Domont<sup>a,s</sup>, Sylvie Bonvalot<sup>a,s,t</sup>, Philippe Terrier<sup>a,s,u,v</sup>, Julien Adam<sup>a,u,v</sup>, Jean-Michel Coindre<sup>w</sup>, Jean-François Emile<sup>x</sup>, Vichnou Poirier-Colame<sup>a,b</sup>, Kariman Chaba<sup>y,z,aa</sup>, Benedita Rocha<sup>ab,ac</sup>, Anne Caignard<sup>ad,ae</sup>, Antoine Toubert<sup>ad,ae</sup>, David Enot<sup>a,y,z,af</sup>, Joachim Koch<sup>ag</sup>, Aurélien Marabelle<sup>a,b,f</sup>, Marion Lambert<sup>ah</sup>, Sophie Caillat-Zucman<sup>ah</sup>, Serge Leyvraz<sup>ai</sup>, Christian Auclair<sup>aj</sup>, Eric Vivier<sup>ak,al,am</sup>, Alexander Eggermont<sup>a</sup>, Christophe Borg<sup>an</sup>, Jean-Yves Blay<sup>ao</sup>, Axel Le Cesne<sup>a,s</sup>, Olivier Mir<sup>a,s</sup>, and Laurence Zitvogel<sup>ab,c,ap</sup>

<sup>a</sup>Gustave Roussy Cancer Campus (GRCC), Villejuif, France; <sup>b</sup>INSERM, U1015, IGR, Villejuif, France; <sup>c</sup>Center of Clinical Investigations in Biotherapies of Cancer (CICBT), Villejuif, France; <sup>d</sup>Department of Pediatric Oncology, GRCC, Villejuif, France; <sup>e</sup>Department of Internal Medicine I, University Hospital of Cologne, Cologne, Germany; <sup>f</sup>Drug Development Department (DITEP), GRCC, Villejuif, France; <sup>g</sup>Hôpital de la Conception, Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille, Marseille, France; <sup>h</sup>INSERM, U1104, Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, Marseille, France; <sup>i</sup>CNRS, UMR7280, Marseille, France; <sup>j</sup>Hamamatsu Tissue Imaging and Analysis Center (TIGA), BIOQUANT, Heidelberg, Germany; <sup>k</sup>National Center for Tumor Diseases, University Hospital Heidelberg, Heidelberg, Germany; <sup>l</sup>Department of Medical Oncology, Centre Hospitalier Universitaire Jean Minjot, Besançon, France; <sup>m</sup>Department of Pathology, Institut Mutualiste Montsouris, Paris, France; <sup>n</sup>Department of Medical Oncology, Sarcoma, Institut Mutualiste Montsouris, Paris, France; <sup>o</sup>Department of Surgery, Institut Mutualiste Montsouris, University of Paris Descartes 5, Paris, France; <sup>p</sup>Department of Gastroenterology and Digestive Oncology, Georges Pompidou European Hospital, University of Paris Descartes 5, Paris, France; <sup>q</sup>Department of Surgery, Georges Pompidou European Hospital, University of Paris Descartes, Paris, France; <sup>r</sup>Department of Medical Oncology, Centre Georges-François Leclerc, Dijon, France; <sup>s</sup>Department of Medicine, Sarcoma committee, GRCC, Villejuif, France; <sup>t</sup>Department of Surgery, GRCC, Villejuif, France; <sup>u</sup>Department of Pathology, GRCC, Villejuif, France; <sup>v</sup>Center of Biological Resources, GRCC, Villejuif, France; <sup>w</sup>Department of Pathology, Institut Bergonié, Bordeaux, France; <sup>x</sup>Department of Pathology, EA4340, Hôpital Ambroise Paré, Boulogne, France; <sup>y</sup>Equipe 11 labellisée par la Ligue Nationale contre le Cancer, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France; <sup>z</sup>INSERM, U1138, Paris, France; <sup>aa</sup>Université Paris Descartes/Paris V, Sorbonne Paris Cité, Paris, France; <sup>ab</sup>INSERM, U1020, Paris, France; <sup>ac</sup>Faculté de Médecine René Descartes, Paris, France; <sup>ad</sup>INSERM, U1160, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France; <sup>ae</sup>Groupe Hospitalier Saint Louis-Lariboisière - F. Vidal, Paris, France; <sup>af</sup>Metabolomics and Cell Biology platforms, GRCC, Villejuif, France; <sup>ag</sup>Institute of Medical Microbiology and Hygiene, University of Mainz Medical Centre, Mainz, Germany; <sup>ah</sup>INSERM, U1149, Equipe "Immunité innée chez l'enfant", Hôpital Robert Debré, Paris, France; <sup>ai</sup>Department of Oncology, University Hospital, Lausanne, Switzerland; <sup>aj</sup>Applied Biology and Pharmacology Laboratory, Ecole Normale Supérieure de Cachan, Cachan, France; <sup>ak</sup>INSERM, U1104, Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, Marseille, France; <sup>al</sup>CNRS, UMR7280, Marseille, France; <sup>am</sup>Aix Marseille Université, UM2, Marseille, France; <sup>an</sup>INSERM 1098, University of Franche-Comté, Besançon, France; <sup>ao</sup>Department of Medicine, Centre Léon Bérard & Université Claude Bernard Lyon I, DGOS-INCA SIRIC, Lyon, France; <sup>ap</sup>University of Paris Sud XI, Villejuif, France

### ABSTRACT

Despite effective targeted therapy acting on *KIT* and *PDGFRA* tyrosine kinases, gastrointestinal stromal tumors (GIST) escape treatment by acquiring mutations conveying resistance to imatinib mesylate (IM). Following the identification of NKp30-based immunosurveillance of GIST and the off-target effects of IM on NK cell functions, we investigated the predictive value of NKp30 isoforms and NKp30 soluble ligands in blood for the clinical response to IM. The relative expression and the proportions of NKp30 isoforms markedly impacted both event-free and overall survival, in two independent cohorts of metastatic GIST. Phenotypes based on disbalanced NKp30B/NKp30C ratio ( $\Delta BC^{low}$ ) and low expression levels of NKp30A were identified in one third of patients with dismal prognosis across molecular subtypes. This  $\Delta BC^{low}$  blood phenotype was associated with a pro-inflammatory and immunosuppressive tumor microenvironment. In addition, detectable levels of the NKp30 ligand sB7-H6 predicted a worse prognosis in metastatic GIST. Soluble BAG6, an alternate ligand for NKp30 was associated with low NKp30 transcription and had additional predictive value in GIST patients with high NKp30 expression. Such GIST microenvironments could be rescued by therapy based on rIFN- $\alpha$  and anti-TRAIL mAb which reinstated innate immunity.

**Abbreviations:** AWD, Alive with disease; EFS, Event-free survival; GIST, Gastrointestinal stromal tumor; IFN- $\gamma$ , Interferon gamma; IM, Imatinib mesylate; NED, Non-evolutionary disease; NK, Natural killer cells; NKp30/NCR3, Natural cytotoxicity receptor p30; NKp46/NCR1, Natural cytotoxicity receptor p46; OS, Overall survival; PFS, Progression-free survival; TKI, Tyrosine kinase inhibitor; TIL, Tumor-infiltrating lymphocytes; TNF- $\alpha$ , Tumor necrosis factor  $\alpha$

### ARTICLE HISTORY

Received 11 November 2015  
Revised 21 December 2015  
Accepted 28 December 2015

### KEYWORDS

Cancer; immunity; B7-H6; GIST; NK cells; NKp30/NCR3

## Introduction

Gastrointestinal stromal tumors (GIST) are the most frequent mesenchymal tumor of the gastrointestinal tract, with an annual incidence of around 10–20 cases per million.<sup>1</sup> GIST are characterized by activating mutations in *KIT* or *PDGFRA* oncogenes, the key molecular drivers of the disease pathogenesis.<sup>2</sup> Approximately 75–80% of GIST harbor a *KIT* mutation, most frequently in the juxtamembrane domain in exon 11, and sometimes in the extracellular domain (exon 9) or in the kinase domain (exons 13 and 17).<sup>3</sup> In 2001, the introduction of IM a small molecule inhibitor of *KIT* and *PDGFRA* tyrosine kinases, has dramatically improved the prognosis of GIST patients, with the best clinical responses observed in patients bearing the exon 11 *KIT* mutation.<sup>4,5</sup> Hence, IM has become a paradigmatic targeted molecular therapy in cancer and the standard of care for advanced localized and metastatic GIST.<sup>6</sup> However, IM is not curative in most GIST patients, requiring continuous treatment in advanced phase, and often associated with the emergence of resistant clones with secondary *KIT* or *PDGFRA* mutations.<sup>7</sup>

Over the last decade, we reported the off-target effects of IM on the immune system. IM targets *KIT* receptors on dendritic cells (DC), unleashing the DC/NK cell cross-talk, leading to NK cell activation with Th1 cytokine release and enhanced cytotoxicity in mice and humans.<sup>8</sup> We previously reported that by 2 months of IM, the increased IFN- $\gamma$  secretion from circulating NK cells correlated with prolonged survival in metastatic GIST patients treated by IM.<sup>9</sup> A comprehensive NK phenotyping in peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes of GIST revealed that the NK cell cytotoxic receptor NKp30 was specifically downregulated in this disease.<sup>9,10</sup> Subsequently, we demonstrated that the alternative splicing of NKp30 exon 4, which affects the signaling and function of NKp30, determined the prognosis of metastatic GIST patients treated with IM.<sup>10</sup> There are three major NKp30 isoforms, each one with a specific intracytoplasmic domain, i.e. NKp30A, NKp30B and NKp30C. NKp30A and NKp30B signaling mediates cytotoxicity and IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  production respectively, while the NKp30C isoform induces the production of the immunosuppressive cytokine IL-10. The relative abundance of the mRNA encoding the NKp30C isoform compared to isoform A or B negatively impacts the prognosis of metastatic GIST patients treated with IM.<sup>10</sup> Importantly, GIST tumors are infiltrated with NK cells, which mostly reside in peri-tumoral areas and predict event-free-survival in localized stages treated with adjuvant IM.<sup>11</sup>

Besides NK cells, other immune cells impact the course of GIST. CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells, regulatory T cells (Treg) and macrophages have been shown to infiltrate GIST.<sup>12,13</sup> In addition, IM induces the apoptosis of Tregs via the inhibition of IDO in *KIT* exon 11 mutated patients, thus enhancing the CD8<sup>+</sup> T cell/Treg ratio and contributing to the intra-tumoral re-location of NK cells.<sup>11,14</sup> Taken together, it is clear that the immune system plays a critical role in GIST during oncogene desaddiction by IM.

The aim of the present study was to explore further predictive biomarkers of response to IM pertaining to the NKp30/NKp30 ligand interaction in metastatic GIST. Here, we validated in two independent cohorts that the ratios between activating and inhibiting NKp30 isoforms ( $\Delta$ BC) predict clinical outcome to IM therapy in metastatic GIST, and we demonstrated that the transcription levels of the NKp30 isoforms impact survival in

localized and metastatic GIST patients independently of the *KIT* mutational status. In addition,  $\Delta$ BC<sup>high</sup> phenotypes contained higher levels of Th1 cytokines *in-situ*, while  $\Delta$ BC<sup>low</sup> tumors released inflammatory and immunosuppressive cytokines and chemokines. Moreover, we show for the first time that the soluble NKp30 ligands sB7-H6 and sBAG6 alone or combined with the transcription levels of NKp30 isoforms, also impact event-free survival in IM-treated metastatic GIST. Altogether, we conclude that the efficacy or resistance of IM can be predicted in distinct subsets of GIST based on four predictors— $\Delta$ BC ratio, NKp30 transcription levels, sB7-H6 and sBAG6. Finally, rIFN- $\alpha$ 2a and anti-TRAIL mAb could restore NK cell IFN- $\gamma$  release in tumor beds presenting with NK functional defects. Thus, NKp30 isoforms and NKp30 ligands act as valuable biomarkers predictive of IM efficacy in metastatic GIST. The use of these predictive biomarkers could help stratify patients destined to benefit from combinatorial regimen involving oncogene desaddiction and immunomodulation.

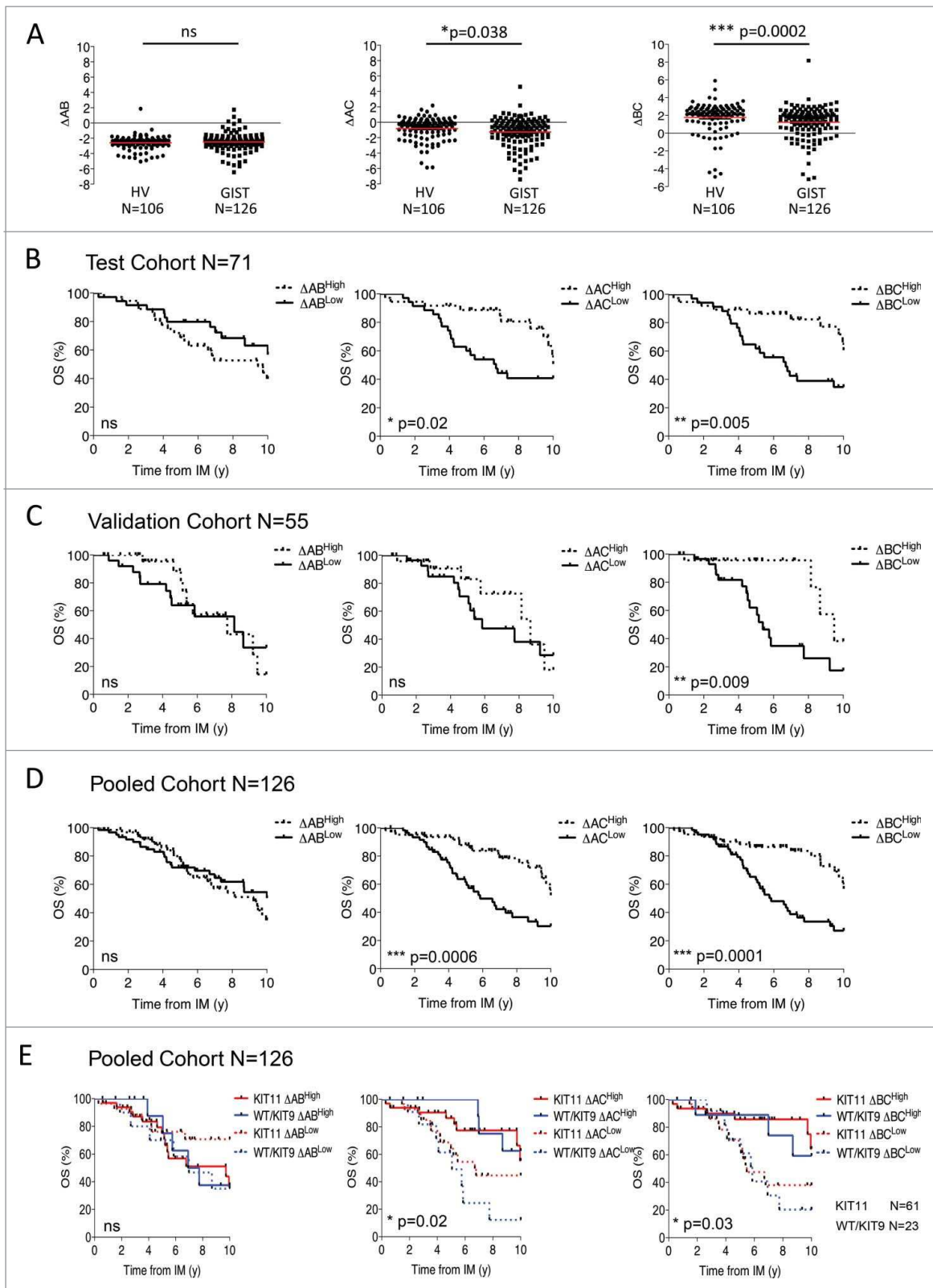
## Results

### Proportion of NKp30 isoforms predict survival in GIST patients

We have previously reported that NKp30 isoform profiles predict the overall survival of metastatic GIST patients.<sup>10</sup> These profiles were originally determined by the unsupervised hierarchical clustering of the proportion of the transcriptional level of each NKp30 isoform. However, variable expression of the three NKp30 isoforms (as already known for KIR variegated expression among NK cells) was detected in single NK cells sorted from blood of healthy donors, with the majority of NK cells expressing only one or two NKp30 isoforms (not shown). Therefore, we assessed the relative expression of NKp30 isoforms compared with each other. We calculated the relative expression of the three isoforms (A, B or C) using the “delta” formula  $\Delta$ NKp30<sub>x</sub> NKp30<sub>y</sub> = Ct NKp30<sub>y</sub> - Ct NKp30<sub>x</sub>. Importantly, this NKp30 cell profiling determined at time of diagnosis prior to IM therapy is stable over time in a longitudinal follow up for a given patient (Fig. S1A). Interestingly,  $\Delta$ BC and to a lesser extent  $\Delta$ AC were significantly lower in metastatic GIST (Table S1) compared with healthy volunteers (HV) while  $\Delta$ AB was in the same range (Fig. 1A). Moreover, the  $\Delta$ BC value, defined according to the median level of the cohort (Table S1), best predicted the overall survival of metastatic GIST from the start of IM therapy in both the test cohort (Fig. 1B) and the validation cohort (Fig. 1C). Expectedly, in the whole metastatic GIST cohort of 126 patients, the  $\Delta$ BC and  $\Delta$ AC predicted not only the overall survival (Fig. 1D) but also the event-free survival (Fig. S1B) of metastatic GIST at the time of IM therapy, independently of the *KIT* mutational status (Fig. 1E). Thus,  $\Delta$ BC<sup>low</sup> and to some extent  $\Delta$ AC<sup>low</sup> NKp30 profiling is associated with poor prognosis despite IM therapy.

### The $\Delta$ BC phenotype is associated with the tumor immune microenvironment

We next investigated the significance of the  $\Delta$ BC phenotype on the GIST microenvironmental immune tone determined *in situ*



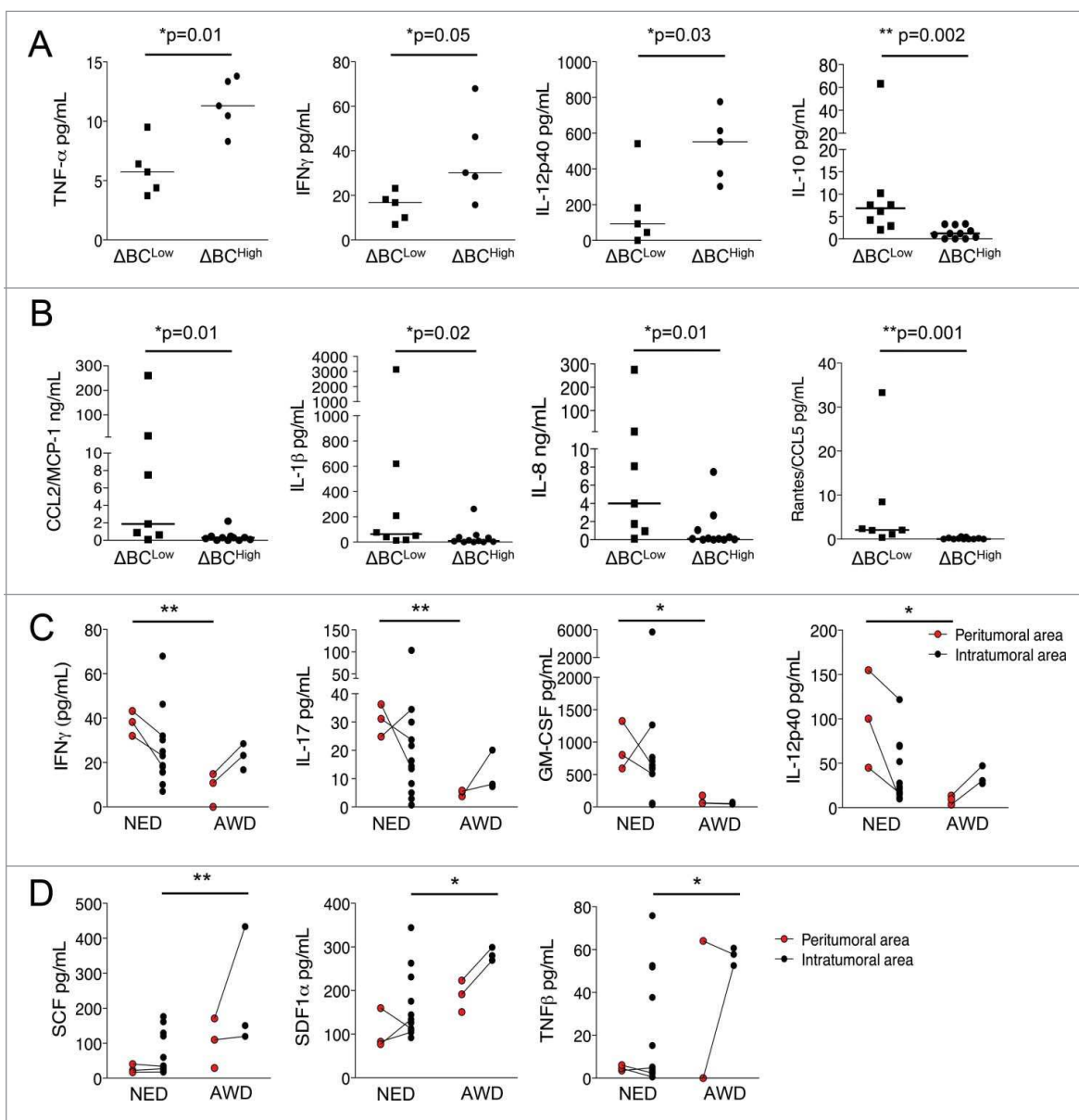
**Figure 1.** NKp30 isoform  $\Delta$  ratios predict overall survival in metastatic GIST patients. (A) The NKp30  $\Delta AB$  (left panel),  $\Delta AC$  (middle panel) and  $\Delta BC$  ratios (right panel) of healthy volunteers (HV,  $n = 106$ ) and of metastatic GIST patients ( $n = 126$ ) are shown, non-parametric Mann-Whitney test. (B)–(D). Overall survival from initial imatinib mesylate (IM) treatment of GIST patients according to the median value of  $\Delta AB$  (left),  $\Delta AC$  (middle) and  $\Delta BC$  ratios (right), were assessed by univariate analysis using the Kaplan–Meier method in a test cohort ( $n = 71$ , B), validation cohort ( $n = 55$ , C) and pooled cohort ( $n = 126$ , D). (E) Kaplan–Meier curves of GIST patient overall survival based on the combination of NKp30  $\Delta$  ratios and the *KIT11* mutational status are shown for the pooled cohort ( $n = 126$ ), Log-rank (Mantel–cox). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . ns = not significant.



by measuring cytokine and chemokine release from live tumor specimen and by multiplex arrays after laser microdissection of stromal (where NK reside) versus tumor nests. Interestingly, fresh GIST specimens (Table S2) harvested from  $\Delta BC^{\text{high}}$  patients exhibited significantly higher levels of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL-12p40 than tumor samples from  $\Delta BC^{\text{low}}$  patients (Fig. 2A), demonstrating the role of NKp30A and NKp30B isoforms in dictating a Th1 profile *in situ*. In contrast, a pro-inflammatory cytokine/chemokine pattern composed of CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 $\alpha$  (not shown), IL-1 $\beta$ , IL-8 and CCL5 was preferentially released from  $\Delta BC^{\text{low}}$  GIST tumors (Fig. 2B). In addition, higher levels of IL-10 were detected in the tumor fluid of  $\Delta BC^{\text{low}}$  patients (Fig. 2A), confirming the implication of

IL-10 with the preferential transcription of the NKp30C isoform *in situ*.<sup>10</sup>

Using laser micro-dissection of frozen GIST samples to compare the cytokine pattern of peri-tumoral vs. intra-tumoral areas, we analyzed GIST bearing a bad prognosis (alive with disease (AWD) at a median time of 20 months post-surgery) compared with GIST bearing a favorable prognosis (non-evolutionary disease (NED), Table S2). The peri-tumoral area in GIST samples from NED patients contained higher amounts of IFN- $\gamma$ , IL-17, GM-CSF and IL-12p40 (Fig. 2C) compared with samples from AWD patients (that are mostly  $\Delta BC^{\text{low}}$ ). In contrast, inflammatory cytokines and chemokines including SCF, SDF1 $\alpha$  and TNF- $\beta$  (Fig. 2D) (with a trend for G-CSF, M-CSF



**Figure 2.** The pro-inflammatory milieu, but not Th1 cytokines are associated with  $\Delta BC^{\text{low}}$  GIST patients. (A) Cytokine secretion (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-12p40) was assessed from frozen tumor samples obtained from  $\Delta BC^{\text{high}}$  (n = 5) and  $\Delta BC^{\text{low}}$  (n = 5) GIST patients, compared using unpaired *t*-test. (B) Chemokine (CCL2/MCP-1 and CCL5) and cytokine (IL-1 $\beta$ , IL-8 and IL-10 (shown in A)) concentrations were measured from tumor samples fluids of  $\Delta BC^{\text{high}}$  (n = 11) and  $\Delta BC^{\text{low}}$  (n = 7) GIST patients, normalized per mg of total protein/mL (as detailed in M&M) and compared using unpaired *t*-test. (C)–(D) Cytokine and chemokine secretion, namely IFN- $\gamma$ , IL-17, GM-CSF, and IL-12p40 (C) as well as SCF, SDF-1 $\alpha$  and TNF- $\beta$  (D), were assessed from micro-dissected stromal and intra-tumoral frozen GIST samples. GIST patients were stratified according to their clinical status, NED—non-evolutionary disease (n = 10) and AWD—alive with disease (n = 4), at a median time of 1.2 y post-surgery, Mann–Whitney test. \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01.

and CCL27/CTACK (not shown)) were detected in the intra-tumoral area of AWD and  $\Delta BC^{\text{low}}$  GIST patients. These data thereby suggest a contribution of NK cells in dictating the microenvironmental tone of the peri-tumoral area, where they reside at diagnosis.<sup>11</sup>

### **Relative expression levels of NKp30 isoforms predict survival in GIST patients**

To further analyze the exact contribution of each NKp30 isoform in the dismal prognosis associated with the  $\Delta BC^{\text{low}}$  GIST phenotype, we assessed the transcriptional levels of NKp30A, NKp30B and NKp30C isoforms, normalized to  $\beta$ -2 microglobulin, in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of 126 metastatic GIST (Table S1), compared with 106 age- and sex-matched HV. The relative expression of NKp30A, B, or C gene products determined at time of diagnosis prior to IM therapy was found to be stable over time, with or without IM, in a longitudinal follow up for a given patient (Fig. S1C). GIST patients presented a deficiency in the expression of all three isoforms (Fig. S2A). The expression levels of NKp30 isoforms correlated with each other but did not reflect the percentages of circulating NK cells ranging from 2–52% of leukocytes (Fig. S3A–B). We then analyzed which of these isoforms are mostly affected in the  $\Delta BC^{\text{low}}$  phenotype of metastatic GIST compared with HV and localized GIST (Table S1). Contrary to the normal pattern where  $\Delta BC^{\text{low}}$  can be attributed to high NKp30C transcription levels (Fig. S2B–C), the  $\Delta BC^{\text{low}}$  phenotype of metastatic GIST is attributable to a drop in the transcription of both NKp30A and NKp30B (Fig. S2D). Next, we analyzed the prognostic value of each individual isoform in the clinical outcome with IM in two independent cohorts of metastatic IM-treated GIST patients (Table S1). The mRNA expression levels of each NKp30 isoform measured at diagnosis ( $n = 67$ , Fig. 3A–B) or at time of sampling ( $n = 126$ , Fig. 3C–D and Fig. S4) impacted both event free survival (Fig. 3A and C) and overall survival (Fig. 3B, D) if GIST patients were stratified in two groups, based on the criterion of NKp30 isoform expression below or above the median level of both cohorts. Hence, high levels of NKp30A, NKp30B and NKp30C predicted favorable survival of metastatic GIST patients from the time of IM therapy or sampling in both test cohort and validation cohort (Fig. S4B–C). Overall, the prognostic value of NKp30 isoform expression levels on the whole cohort was highly significant and independent of the mutational status of the proto-oncogene *KIT* (Fig. 3E). To assess the specificity of the prognostic value of NKp30, we analyzed the expression of another NK cell activating receptor NKp46 on a subgroup of 71 GIST patients. Although NKp30 and NKp46 expression levels correlated (Fig. S3B), NKp46 expression failed to influence the overall survival of metastatic GIST patients (Fig. S3C), while that of NKp30 remained predictive in this subgroup (shown for NKp30A, Fig. S3D).

The prognostic value of NKp30A, NKp30B and NKp30C isoforms was also evaluated in a cohort of locally advanced GIST patients treated by adjuvant or neoadjuvant IM ( $n = 60$ , Table S1). Here again, the levels of NKp30A, NKp30B and NKp30C expression were statistically lower in localized GIST than in HV (Fig. S5A) and predicted progression-free survival

from the time of IM therapy (Fig. S5B). However, in contrast to metastatic GIST, the NKp30 isoform expression levels were relevant for the prognosis of GIST harboring either a *KIT* WT or *KIT* exon 9 mutation, but not those harboring a mutation in *KIT* exon 11 (Fig. S5C).

Thus, high transcription levels of the NKp30 isoforms had a favorable impact on the survival of localized and metastatic GIST patients from the start, and in the course, of oncogene desaddiction.

### **Combined relative expression levels and proportions of NKp30 isoforms highlight a subgroup of metastatic GIST patients with poor prognosis**

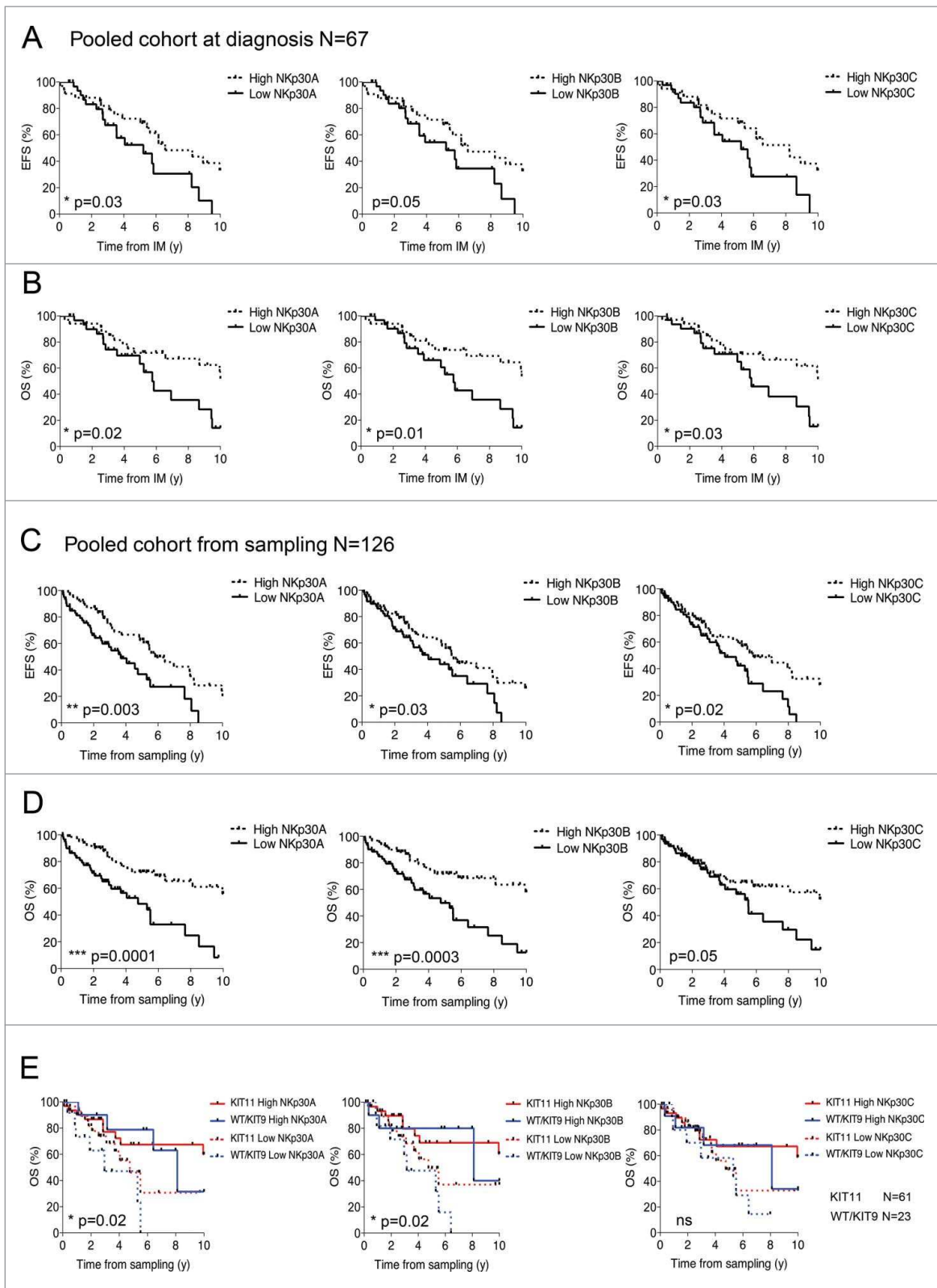
To analyze the prognostic significance of the quantitative and the qualitative distributions of NKp30 isoforms, we tested their coordinated impact on the prognosis in the whole cohort of metastatic GIST patients (Table S1). The  $\Delta BC$  ratios, combined with low NKp30A (Fig. 4) but not NKp30B or NK30C (Fig. S6), remained prevailing biomarkers dictating GIST event-free survival and overall survival, when evaluated at diagnosis ( $n = 67$ , Fig. 4A, upper and lower panels) or at time of sampling ( $n = 126$ , Fig. 4B, upper and lower panels). In multivariate analysis using Cox model, only  $\Delta BC$  ratio, and NKp30A (overall survival), or NKp30C (event-free survival) were retained as independent prognostic factors for survival from the date of sampling, while metastatic sites, nature of mutations, gender were not retained (Table 1).

Taken together, the  $\Delta BC$  status is the predominant prognosis biomarker for metastatic GIST, predicting both event-free survival and overall survival in response to IM therapy. For the poor prognostic subgroup harboring a  $\Delta BC^{\text{low}}$  phenotype, consideration of the relative expression of the NKp30A isoform has an added value to identify the most IM-resistant diseases.

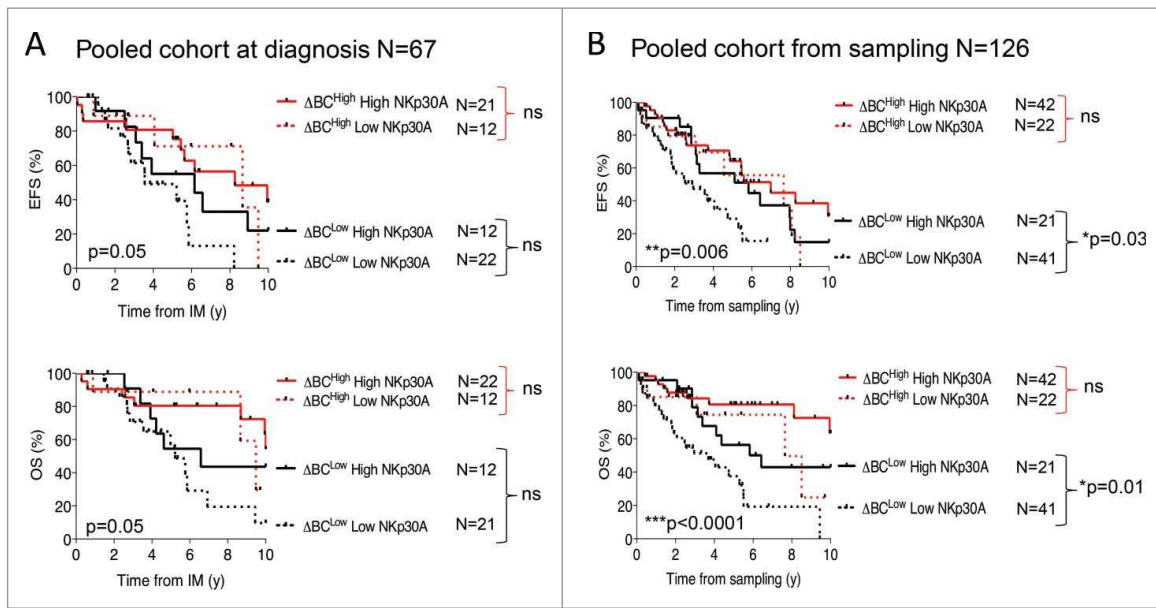
### **Serum levels of soluble NKp30 ligands B7-H6 and BAG6 are biomarkers in metastatic GIST patients**

We monitored the serum levels of two NKp30 ligands, sB7-H6 and sBAG6, in metastatic GIST patients at the time of diagnosis and following IM therapy (Table S1). Soluble B7-H6 was detected in the serum of GIST patients particularly prior to surgery (Fig. 5A, left panel), with more abundant levels in metastatic than in localized GIST patients (not shown), while sBAG6 was not associated with the tumor load (Fig. 5A, right panel). In addition, sB7-H6 levels, and not sBAG6, decreased with IM therapy after at least 6 months of administration (Fig. 5B, left and right panel respectively), suggesting that sB7-H6 concentrations reflect tumor burden. Of note, sB7-H6 and sBAG6 did not correlate with the *KIT* mutational status (not shown). The circulating levels of sB7-H6 at diagnosis were not associated with the NKp30  $\Delta BC$  ratio (Fig. 5C, left panel). In contrast, NK cells from patients with detectable Serum levels of sBAG6 expressed significantly lower levels of NKp30A, NKp30B, and to some extent NKp30C isoform mRNA in both localized (Fig. S7A) and metastatic GIST (Fig. S7B) and exhibited a higher probability to fall into the  $\Delta BC^{\text{low}}$  GIST subgroup (Fig. 5C, right panel). In GIST tumor lysates, sBAG6 levels were even higher than the paired plasma concentrations





**Figure 3.** Relative expression levels of NKp30 isoforms predict EFS and OS in metastatic GIST patients. Event-free survival (A & C) and overall survival (B & D) of metastatic GIST patients according to the median relative expression of NKp30A (left), NKp30B (middle) and NKp30C (right) isoforms, was assessed at the start of imatinib mesylate (IM) therapy at diagnosis (A–B, n = 67) and at the time of sampling (C–D, n = 126) by univariate analysis using the Kaplan–Meier method. (E) Kaplan–Meier curves of overall survival based on combination of the relative expression of NKp30 isoforms with the *KIT11* mutation status are shown for the pooled cohort (n = 126). \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.001 by Log-rank (Mantel–cox) test.



**Figure 4.** NKp30  $\Delta$ BC ratio combined with NKp30A isoform relative expression highlight a subgroup of metastatic GIST patients with poor prognosis. Kaplan–Meier curves of event free survival (upper panels) and overall survival (lower panels) obtained by stratifying the pooled metastatic GIST cohort ( $n = 126$ ) from the beginning of imatinib mesylate (IM) treatment (A) or at the time of sampling (B), into four groups according to the median value of NKp30  $\Delta$ BC ratio with the median relative expression of NKp30A isoform. Of note, Fig. S6 shows segregation based on the median value of NKp30  $\Delta$ BC ratio with the median relative expression of NKp30B and C isoforms. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  by Log-rank (Mantel–cox) test.

(Fig. S7C), suggesting a gradient from the tumor microenvironment to the lymphoid organs. However, sBAG6 in plasma was not associated with tumor-derived exosomes.<sup>15</sup> Indeed the ultracentrifugation of plasma samples from GIST patients allowed the detection of the soluble but not exosomal forms of BAG6 (Fig. S7D).

More importantly, detectable levels of sB7-H6 assessed at diagnosis in 50 cases, before IM therapy, predicted short event-free survival in metastatic GIST patients (Fig. 5D, left panel), independently of the *KIT* mutational status (not shown). In addition, detectable levels of sBAG6, found in 12 out of 29 of cases at diagnosis failed to predict event-free survival in this small number of metastatic GIST for whom serum was available prior to IM therapy (not shown) but predicted dismal prognosis at any time of sampling during the course of IM administration (Fig. 5D, right panel). In 29 metastatic GIST patients for whom sB7-H6 and sBAG6 levels were evaluable, a minority (4/29) of GIST patients exhibited detectable levels of both sB7-H6 and sBAG6, while most cases presented with the exclusive presence of either one of these NKp30 agonists (Fig. 5E, left panel). Patients presenting no circulating soluble NKp30 ligands (9/29) were of excellent prognosis with IM therapy (Fig. 5E, right panel). The sB7-H6 was the strongest soluble

parameter to predict event-free survival, but sBAG6 added prognostic value to this favourable sB7-H6-negative patient subgroup, representing 47% of patients with dismal prognosis (Fig. 5E, right panel).

As controls, the levels of two NKp30-independent markers such as soluble thrombospondin (a marker of Treg induction<sup>16</sup>) and osteopontin (a marker of tumor progression<sup>17</sup>) had no impact on the event-free survival of metastatic GIST in response to IM (Fig. S8).

### Predictive algorithm of all NKp30-related predictors in metastatic GIST

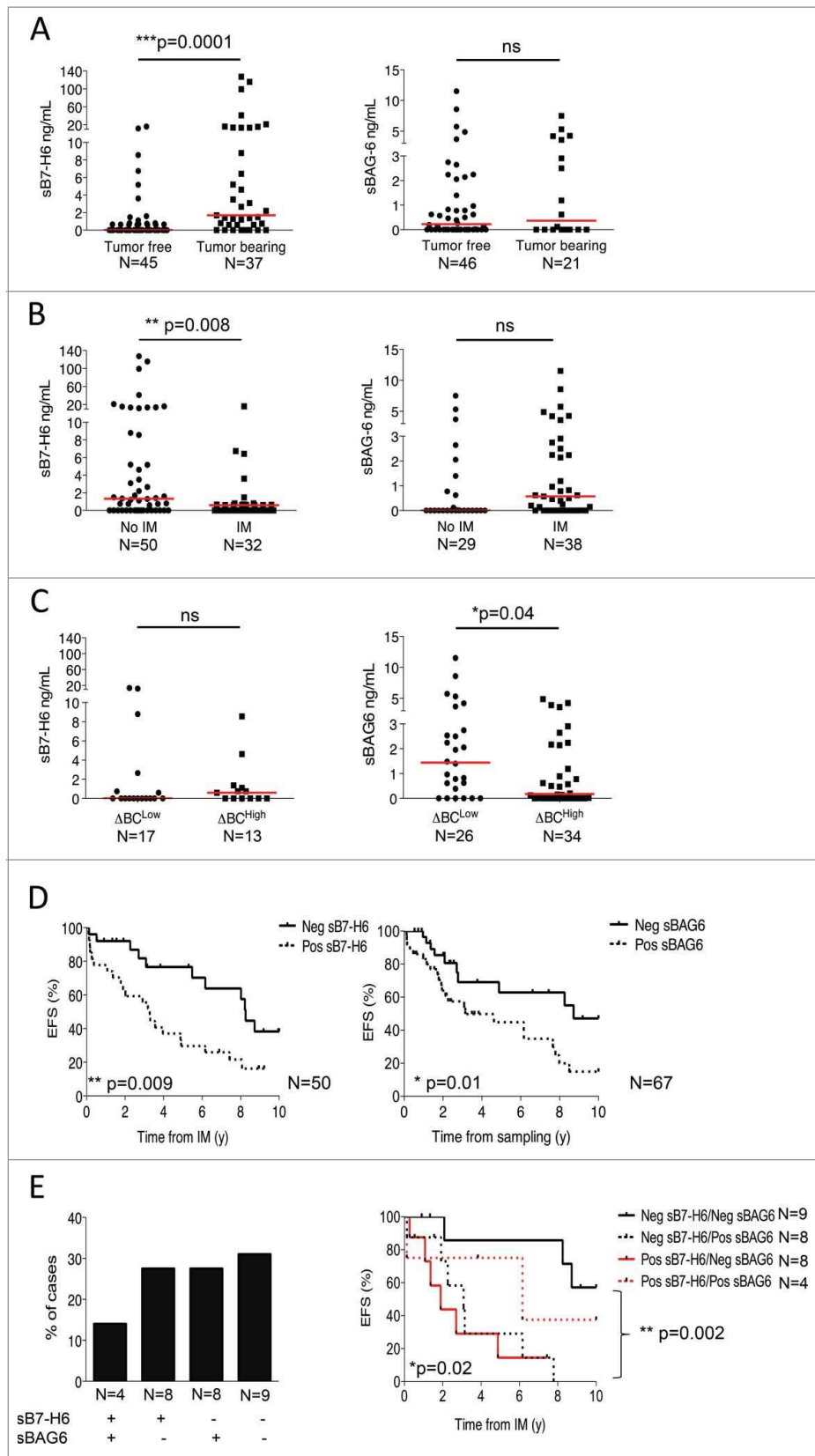
Importantly, the serum levels of NKp30 ligands did not add any predictive value to the  $\Delta$ BC ratio (Fig. 6A). In the favorable-prognosis subgroup of sB7-H6 negative individuals, a minority of 13% of patients presenting with low NKp30A (with a trend for NKp30B and NKp30C) transcripts exhibited a shorter event-free survival (Fig. 6B, Fig. S9A, left and right panels). In contrast, sBAG6 added prognostic value to the high NKp30C transcription level subgroup (and to a lesser extent to the high NKp30A and NKp30B transcription subgroups), representing a subset of 26% of patients with dismal prognosis (Fig. 6C, Fig. S9B, left and right panels).

### GIST TILs respond to ex vivo stimulation with rIFN- $\alpha$ or anti-TRAIL mAb

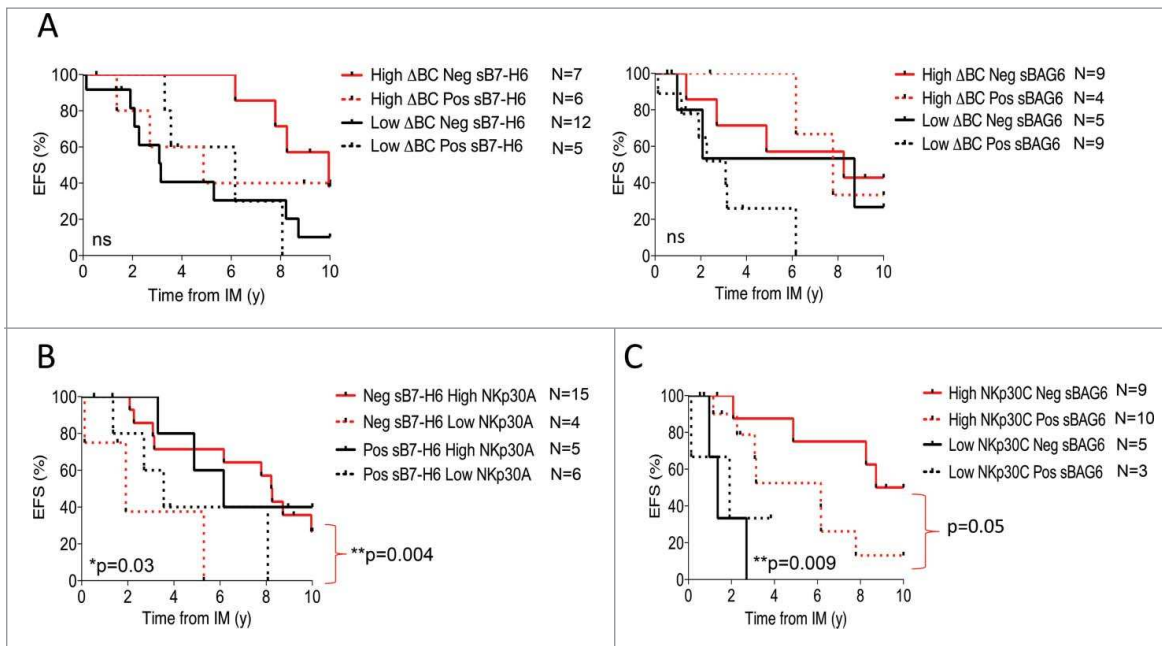
We tested the capacity of various immunomodulatory molecules to reinstate local immunity in TILs, including NK cells, with particular attention to  $\Delta$ BC<sup>low</sup> phenotypes. Seven primary GIST tumors harvested post-surgery (Table S2) were immunophenotyped by flow cytometry to characterize TILs. The

**Table 1.** Multivariate analysis of prognosis factors for survival of metastatic GIST patients from the date of sampling (Cox model).

	Parameter	HR (95% CI)	$p$ value
Event-free survival	$\Delta$ BC	0.53 (0.32–0.89)	0.012
	NKp30C	0.53 (0.31–0.89)	0.015
Overall survival	$\Delta$ BC	0.46 (0.25–0.84)	0.013
	NKp30A	0.38 (0.27–0.68)	0.002



**Figure 5.** Soluble NKp30 ligands, B7-H6 and BAG6, are biomarkers in metastatic GIST patients. (A)–(C) Levels of sB7-H6 (left panel) and sBAG6 (right panel) measured in metastatic GIST patient serum as related to tumor resection (A), to IM therapy (B) or to the  $\Delta$ BC ratio (C). (D) Event-free survival of metastatic GIST patients from the time of IM according to the median value of sB7-H6 ( $n = 50$ , left panel) and from the time of sampling in the course of IM therapy according to the median value of sBAG6 ( $n = 67$ , right panel) was assessed using the Kaplan–Meier method. (E) Representative frequency of metastatic GIST patient presenting no, either one, or both soluble NKp30L at diagnosis, prior to IM therapy ( $n = 29$ , left panel). Kaplan–Meier curves of event free survival of 29 metastatic GIST patients from the time of IM according to serum levels of both NKp30 ligands \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , ns—not significant by non-parametric Mann–Whitney test in (A)–(C); \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  using the Kaplan–Meier method in (D)–(E).



**Figure 6.** Event-free survival in metastatic GIST can be best predicted by the coordinated analysis of several NKp30-related parameters. (A) Event-free survival of metastatic GIST patients from the time of IM according to the  $\Delta BC^{\text{low}}$  phenotype and the median values of sB7-H6 ( $n = 30$ , left panel) or sBAG6 ( $n = 27$ , right panel) was assessed using the Kaplan–Meier method. (B)–(C) Analysis of predictive interactions between the relative expression levels of NKp30 isoforms and serum levels of NKp30 ligands. Event-free survival of metastatic GIST patients from the time of IM according to the sB7-H6 levels and NKp30A relative expression (B) and the median value of the levels of NKp30 isoforms C and sBAG6 levels (C), using the Kaplan–Meier method. Of note, Fig. S10 shows EFS of NKp30L levels with the additional NKp30 isoforms. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , ns: not significant by Log-rank (Mantel–Cox) test.

frequencies of  $CD45^+$  cells (ranging from 10 to 65% (Fig. S10A) comprised various percentages of NK cells (from 1.4% to 11.1% of  $CD3^-CD56^+/CD45^+$ , Fig. S10B) and T cells, essentially  $CD4^+$  T cells (Fig. S10C), ranging from 14 to 38% of  $CD45^+$  cells (not shown)). Most GIST-derived TILs were capable of producing  $IFN-\gamma$  (four out of seven, Fig. S10D) and  $TNF-\alpha$  (five out of seven, Fig. S10E) at baseline upon short stimulation with PMA/ionomycin, independently of GIST tumor invasion and T or NK cell frequencies.

TILs were incubated for 24 h with either r $IFN-\alpha$ , the TLR3 ligand Poly I:C, neutralizing anti-FasL mAb, anti-TRAIL mAb or anti-IL-10 mAb (or the corresponding isotype controls), then analyzed for their intracellular concentrations of  $IFN-\gamma$  and  $TNF-\alpha$  by flow cytometry.  $IFN-\alpha 2a$  induced a 2- to 3-fold increase of  $IFN-\gamma^+$  NK cells (in five out of six patients, Fig. S10F). In addition, anti-TRAIL mAb stimulated NK cells (Fig. S10F),  $CD4^+$  T cells (Fig. S10G) and, in one patient,  $CD8^+$  T cells to produce  $IFN-\gamma$  with up to 6-fold increase in  $IFN-\gamma^+$  NK cells (Fig. S10H). T cell proliferation was monitored after 5 d of stimulation and showed an increase in  $KI67^+CD4^+$  and  $KI67^+CD8^+$  T cells following addition of anti-FasL, anti-TRAIL, and anti-IL-10 mAbs (Fig. S10I–J). Thus, TILs derived from  $\Delta BC^{\text{high}}$  or  $\Delta BC^{\text{low}}$  GIST patients, can be activated *ex vivo* by a number of immune stimulators.

## Discussion

Here, we report that the expression of NKp30 isoforms and soluble NKp30 ligands are strong predictive biomarkers of response to IM therapy in metastatic GIST. The NKp30 isoform ratio (measuring the predominance of the stimulatory

NKp30B isoform over the suppressive NKp30C isoform in  $\Delta BC^{\text{high}}$  patients) and the normal/high level of expression of NKp30 isoforms (NK cell fitness) were found to predict favorable event-free survival and overall survival in metastatic GIST following IM therapy in two distinct series of patients. Consistent with these observations, the soluble NKp30 ligands sB7-H6 and sBAG6, known to dampen NKp30-dependent NK cell functions,<sup>18,19</sup> alone or in coordination, also negatively predicted GIST patient event-free survival. The  $\Delta BC$  ratio and the serum levels of sB7-H6/sBAG6 appear to play somewhat overlapping roles in the predictive model of response to IM. In addition, the relative expression of the rare NKp30A transcripts had an additive value to the  $\Delta BC$  ratio or to the soluble NKp30 ligand prognostic biomarkers, and helped segregate the cohort into subgroups highlighting those patients most resistant to IM. The correlation of a  $\Delta BC^{\text{low}}$  phenotype with a non-Th1, but pro-inflammatory tumor microenvironment confirms the role of NKp30 in dictating functional cross-talk between cells of the tumor microenvironment as previously shown in GIST<sup>10</sup> and reported by us in high-grade neuroblastoma.<sup>18</sup> Encouragingly, the capacity of immunostimulatory molecules, such as  $IFN-\alpha 2a$ , to reactivate NK cells and T lymphocytes from bad prognosis  $\Delta BC^{\text{low}}$  patients *ex vivo*, emphasizes the potential benefit of future combination therapies combining immunotherapeutic strategies to oncogene desaddiction-targeted regimen to promote NK and T cell activity in GIST  $\Delta BC^{\text{low}}$  patients, or those patients relapsing after IM monotherapy.

Since tumor cells downregulate MHC class I molecules and express several stress-related ligands, NK cells were thought to be the major players in antitumor immune responses, as shown



for virally infected cells.<sup>20</sup> However, several murine studies using specific mAbs depleting NK or T cells pointed to a clear role of NK cells against metastases formation rather than in the control of primary tumors.<sup>21–23</sup> The prognosis value of NK cell infiltrates in human malignancies has been investigated, using various NK cell-related markers (CD56, CD57, CD16, NKp46) in primary solid tumors after surgical resection. In nearly all the reports, NK cells were underrepresented in the inflammatory infiltrates,<sup>24</sup> except in colorectal carcinoma<sup>25</sup> and in GIST<sup>11</sup> where they mostly resided in the peri-tumoral areas.<sup>11,26,27</sup> NK cell functions were also seen to be repressed in tumor beds in breast and lung malignancies, due to a downregulation of their natural cytotoxic receptors.<sup>26,28,29</sup> Hence, in most malignancies, NK cell abundance in TILs fails to correlate with clinical outcome.<sup>24,30–32</sup> This is however a tumor-specific phenomenon, as NK cell receptors (NKp30 or KIR) strongly influenced the prognosis in RCC,<sup>33</sup> GIST,<sup>11</sup> neuroblastoma,<sup>18</sup> and acute myeloid leukemia,<sup>34</sup> over NK cells themselves. The biology underlying these different observations across tumor types remains unclear.

In the particular setting of GIST, the natural immune infiltrates, mainly composed of T cells, Tregs, macrophages and NK cells,<sup>11–13</sup> are polarized by the standard GIST-targeted therapy, IM. Indeed, IM does activate NK cells to produce IFN- $\gamma$  via activation of DC/NK cross-talk.<sup>8,9</sup> Another BRAF tyrosine kinase inhibitor, vemurafenib, has been recently shown to directly promote NK cell functions that may contribute to the clinical response in melanoma patients.<sup>35</sup>

We show here that the fitness of NK cells in GIST relies on the  $\Delta$ BC ratio (measuring the predominance of the stimulatory NKp30B isoform over the suppressive NKp30C isoform) and on the NKp30 mRNA transcriptional levels, independently of the *KIT* mutational status. The  $\Delta$ BC ratio represented a strong prognosis biomarker of GIST outcome in metastatic patients. Our group has also demonstrated that the  $\Delta$ BC ratio dictates the progression-free survival of high-risk neuroblastoma patients after induction chemotherapy.<sup>18</sup> In addition, the transcriptional level of NKp30 not only predicted the event-free survival and overall survival of metastatic GIST, but also the progression-free survival of localized WT or *KIT* exon 9 mutated patients. The combination of both predictors, NKp30 relative isoform ratios and transcription levels, further identifies a subgroup of patients with dismal prognosis (i.e.,  $\Delta$ BC<sup>low</sup> with low transcription of NKp30 mRNA), who could benefit from a personalized immunotherapeutic strategy aimed at increasing NKp30 isoform transcription. Indeed, IL-2 or IL-15 are two efficient cytokines to upregulate all three NKp30 isoforms in a stoichiometric manner (SR, unpublished data).

In addition, sB7-H6 predicts the event-free survival of metastatic GIST patients independently of the *KIT* mutational status. We have previously shown that sB7-H6 levels inversely correlate with NKp30 surface expression, and with reduced IFN- $\gamma$  release by NK cells upon recognition of B7-H6<sup>+</sup> tumor target cells.<sup>18</sup> Thus, sB7-H6 acts in the periphery, at least in part, by masking the NKp30 receptor and by reducing NKp30-dependent NK cell functions. In contrast to sB7-H6, sBAG6 levels were specifically associated with the downregulation of NKp30 isoform mRNA transcription, without causing it. It has

been shown that sBAG6 inhibits NKp30-dependent functions of NK cells.<sup>15,36</sup> The presence of sB7-H6 or sBAG6 in the serum detected at diagnosis or at sampling was associated with a reduction in the event-free survival of metastatic GIST patients on IM therapy in univariate analyses.

To combat this, the use of sB7-H6 and/or sBAG6-blocking mAbs, or NKp30-blocking mAbs for  $\Delta$ BC<sup>low</sup> patients, could prevent the NKp30-NKp30 ligand-mediated immunosuppression of NK cells.<sup>37</sup> B7-H6 bispecific T cell engagers or CAR T cells engineered with antibodies targeting B7-H6 are under investigation.<sup>38</sup> A bispecific antibody recognizing NKp46 and a cancer antigen could by-pass the need for the versatile NKp30 receptor.

The correlation of a  $\Delta$ BC<sup>low</sup> phenotype with a non-Th1, but pro-inflammatory tumor microenvironment demonstrates the role of NKp30 in dictating functional cross-talk between cells of the tumor microenvironment. More recently, IM was shown to polarize M1 macrophages into unfavorable M2 macrophages,<sup>39</sup> a scenario that may worsen the tumor microenvironment and contribute to the poor clinical outcome of  $\Delta$ BC<sup>low</sup> GIST patients.

Encouragingly, we also show that GIST-derived TILs, including those from poor-prognosis  $\Delta$ BC<sup>low</sup> patients, can be reactivated to produce cytokines and to proliferate upon stimulation with IFN- $\alpha$ 2a (as already shown in a pilot study in GIST patients<sup>40</sup>), or with blocking mAbs to TRAIL. This emphasizes the potential to develop novel IM-immunotherapeutic combination strategies, which might benefit  $\Delta$ BC<sup>low</sup> patients or patients that relapse under IM. In addition, as IM fails to reduce Treg levels in WT GIST, a combined therapy of IM with metronomic cyclophosphamide, anti-CTLA-4, or anti-IDO could have therapeutic benefit in this patient subgroup.<sup>14</sup>

GIST has come of age as another example of a malignancy entering the arena of immunomodulation, in which personalized immunotherapy can be envisioned based on NKp30 isoform profiling and NKp30 ligand recirculation.

## Materials and methods

### Patients and specimens

Patient characteristics are depicted in Table S1. The analysis of NKp30 isoform transcripts was performed on 60 localized and a total of 126 metastatic GIST ( $n = 71$  for the test and  $n = 55$  for the validation cohort), while the soluble NKp30 study was performed on 92 metastatic GIST patients with available serum sample. The study on fresh tumors was prospectively performed on 27 GIST patients enrolled for surgery (Table S2). Patient samples were provided by Gustave Roussy Institute (Villejuif, France), Leon Bérard center (Lyon, France), Georges-François Leclerc Center (Dijon, France), University Hospital Jean Minjoz (Besançon, France), Institute Mutualiste Montsouris (Paris, France) and European Hospital Georges Pompidou (Paris, France). The study was approved by the local ethic committee (2007-A00923-50) and informed written consent was obtained from patients. Clinical responses were assessed by computed tomography (CT) scan and the responses were classified according to RECIST.<sup>41</sup> One hundred and six healthy volunteers were used as controls (EFS, Créteil and Besançon, France).

### Peripheral blood mononuclear cells (PBMC)

PBMC were obtained by Ficoll-Hypaque density gradient (PAA Laboratories), washed twice in Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS, GIBCO Invitrogen), re-suspended in RLT buffer containing  $\beta$ -2 mercaptoethanol (Quiagen) to preserve the RNA quality, and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Serum or plasma were obtained by centrifugation of whole blood or heparinized-blood respectively (2,000 rpm, 15 min), followed by a second centrifugation (20 min, 5,000 rpm) to remove platelets, and were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### qRT-PCR

Total cellular RNA was isolated from PBMC and GIST tumor samples with the RNeasy kit (Qiagen) following the manufacturer's recommendations. First strand cDNA was synthesized from 1  $\mu\text{g}$  of total RNA using SuperScript<sup>TM</sup> III Reverse Transcriptase (Invitrogen) and random primers (Promega) according to the manufacturer's recommendations.

For qRT-PCR, 5  $\mu\text{L}$  of first-strand cDNA was mixed with 12.5  $\mu\text{L}$  of 2X TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems). For NKp30 isoforms A, B, and C and NKp46: 0.75  $\mu\text{L}$  primers (10  $\mu\text{M}$ ) and probe (5  $\mu\text{M}$ ); and for the  $\beta$ -2-microglobulin housekeeping gene ( $\beta$ 2M): 0.5  $\mu\text{L}$  of primers (10  $\mu\text{M}$ ) and probe (5  $\mu\text{M}$ ), were used in a final volume of 25  $\mu\text{L}$ . A StepOnePlus System (Applied Biosystems) was used for temperature cycling and real time fluorescence measurement. The PCR conditions were as follows: initial incubation at  $50^{\circ}\text{C}$  for 2 min, denaturation at  $95^{\circ}\text{C}$  for 10 min, followed by 45 cycles at  $95^{\circ}\text{C}$  for 15 s, and  $60^{\circ}\text{C}$  for 1 min. PCR primers and TaqMan probes are listed in Table S3. The relative expression of the gene of interest was calculated with the  $2^{-\Delta\text{Ct}}$  method<sup>42</sup> normalized to the expression level of  $\beta$ 2M, with the following formula:  $2^{-\Delta\text{Ct}} = 2^{(\text{Ct}[\text{gene of interest}] - \text{Ct}[\text{housekeeping gene}])} \times 10^6$ . The level of expression of the distinct NKp30 isoforms compared with each other (delta,  $\Delta$ ) was determined using the following formula  $\Delta\text{NKp30}_x \text{ NKp30}_y = \text{CtNKp30}_y - \text{CtNKp30}_x$ , with Ct = Cycle threshold. The median of each NKp30 isoform pair delta ( $\Delta$ ) was used for the survival curve analysis.

### sB7-H6 and sBAG6 serum detection by ELISA

Soluble B7-H6 and BAG6 were assessed from the sera and plasma of GIST patients by an ELISA method. For this, B7-H6 (17B1.3) or BAG6 (3E4) mAb were coated at 5 or 1.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in 0.1 M  $\text{NaHCO}_3$  solution or PBS respectively overnight at  $4^{\circ}\text{C}$  in 96-well Nunc-Immuno<sup>TM</sup> plates (Thermo Scientific). Blocking solution (PBS supplemented with 3% or 1% BSA) was then added for 1 h at room temperature or overnight at  $4^{\circ}\text{C}$ . After four washes with PBS plus 0.05% Tween 20, serial dilutions of sB7-H6, sBAG6, or serum samples were incubated for 2 h at room temperature. Then biotinylated B7-H6 (9G9.2, homemade, 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in PBS supplemented with 1% BSA) or polyclonal chicken anti-BAG6 (13pp2, 7.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in PBS, raised against recombinant BAG6 N-terminus) were added to each well for 1 h at room temperature. Streptavidin-conjugated HRP (Sigma Aldrich) or goat anti-chicken-POD was then added for

1 h at room temperature. For sB7-H6 detection, BD Optia TMB substrate (BD Biosciences) was incubated during 15–30 min at room temperature. For sBAG6, tetramethylbenzidine substrate (ThermoScientific; CatNo. #34029) was used and incubated for 20 min at  $37^{\circ}\text{C}$ . The reaction was stopped with 1 M HCl or 0.5 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  and the optical density (OD) was measured at 450 nm with an Apollo LB 911 instrument (Bert-hold) or with a SpectraMax M4 (Molecular Devices).

### GIST micro-dissection and chemokine studies

Chemokine and cytokine detection in frozen GIST patient tissue was performed from dissected tissue sections. Tissues were sectioned and dissected using a vacuome (Microm HM550 modified Leica AS LMD system). Hematoxylin staining was used to identify regions of interest. Small pieces of frozen tissue were transferred into 250  $\mu\text{L}$  cold lysis buffer, vortexed, frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  (10 min), and thawed on ice. After incubation in a cold ultrasonic bath (10 min), samples were frozen again at  $-80^{\circ}\text{C}$ , thawed on ice and centrifuged (13,000 rpm, 20 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ). The protein concentration of the supernatant was determined and adjusted to 1,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  using human serum diluent (BioRad). Cytokine and chemokine concentrations in tissue lysates were quantified by multiplex protein arrays, according to manufacturer's instructions (BioRad).

### Statistical analyses

Data were analyzed with Prism 5 software (GraphPad San Diego, CA, USA) and the IBM SPSS 19 software (IBM, Bois-Colombe, France). The unpaired t-test and the non-parametric Mann-Whitney test were used for comparison of the different groups, as indicated in the Figure Legends. Correlations were analyzed by Spearman test, and survival curves were plotted according to the Kaplan-Meier method and compared by log-rank (Mantel-Cox) regression (univariate analysis) or by Firth's penalized-likelihood Cox regression (multivariate analysis). A  $p$  value of  $< 0.05$  was considered statistically significant.

### Disclosure of potential conflicts of interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

### Funding

This work was supported by the Ligue Nationale contre le Cancer (Equipe labellisée); the Foundation ISREC, Lausanne; the Paris Alliance of Cancer Research Institutes (PACRI), the SIRIC-Socrate (grant INCa-DGOS-INSERM 6043), SIRIC-LYRIC (grant INCa-DGOS-INSERM 4664), LABEX Immuno-Oncology, Labex DevweCan (ANR-10-LABX-0061), the NETSARC/RREPS networks, the Swiss Bridge Foundation and the foundation "Ensemble contre le GIST." EV is supported by European Research Council (THINK advanced grant). KSR and EPvS were supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (grant KFO286, RP4). SA is the recipient of the 2014 Georges Mathé prize (ESMO grant). We thank Dr Nicolas Delahaye and Dr Cédric Ménard for initiating the study and the tumorothèque of Gustave Roussy and Franche-Comté (BB-0033-00024) for patients sample collection. Thanks to all the participating patients.

## References

- Corless CL. Assessing the prognosis of gastrointestinal stromal tumors: a growing role for molecular testing. *Am J Clin Pathol* 2004; 122:11-3; PMID:15272524; <http://dx.doi.org/10.1309/BUVLRQBVGU0N0L42>
- Corless CL, Barnett CM, Heinrich MC. Gastrointestinal stromal tumours: origin and molecular oncology. *Nat Rev Cancer* 2011; 11:865-78; PMID:22089421; <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3143>
- Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, Hashimoto K, Nishida T, Ishiguro S, Kawano K, Hanada M, Kurata A, Takeda M et al. Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* 1998; 279:577-80; PMID:9438854; <http://dx.doi.org/10.1126/science.279.5350.577>
- Wozniak A, Rutkowski P, Schoffski P, Ray-Coquard I, Hostein I, Schildhaus HU, Le Cesne A, Bylina E, Limon J, Blay JY et al. Tumor genotype is an independent prognostic factor in primary gastrointestinal stromal tumors of gastric origin: a European multicenter analysis based on ConticaGIST. *Clin Cancer Res* 2014; 20:6105-16; PMID:25294914; <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-1677>
- Demetri GD, von Mehren M, Blanke CD, Van den Abbeele AD, Eisenberg B, Roberts PJ, Heinrich MC, Tuveson DA, Singer S, Janicek M et al. Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *N Engl J Med* 2002; 347:472-80; PMID:12181401; <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa020461>
- ESMO. Gastrointestinal stromal tumours: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2014; 25 Suppl 3:iii21-6; PMID:25210085; <http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mdu255>
- Pierotti MA, Tamborini E, Negri T, Pricl S, Pilotti S. Targeted therapy in GIST: in silico modeling for prediction of resistance. *Nat Rev Clin Oncol* 2011; 8:161-70; PMID:21364689; <http://dx.doi.org/10.1038/nrclinonc.2011.3>
- Borg C, Terme M, Taieb J, Menard C, Flament C, Robert C, Maruyama K, Wakasugi H, Angevin E, Thielemans K et al. Novel mode of action of c-kit tyrosine kinase inhibitors leading to NK cell-dependent antitumor effects. *J Clin Invest* 2004; 114:379-88; PMID:15286804; <http://dx.doi.org/10.1172/JCI21102>
- Menard C, Blay JY, Borg C, Michiels S, Ghiringhelli F, Robert C, Nonn C, Chaput N, Taieb J, Delahaye NF et al. Natural killer cell IFN-gamma levels predict long-term survival with imatinib mesylate therapy in gastrointestinal stromal tumor-bearing patients. *Cancer Res* 2009; 69:3563-9; PMID:19351841; <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-3807>
- Delahaye NF, Rusakiewicz S, Martins I, Menard C, Roux S, Lyonnet L, Paul P, Sarabi M, Chaput N, Semeraro M et al. Alternatively spliced NKp30 isoforms affect the prognosis of gastrointestinal stromal tumors. *Nat Med* 2011; 17:700-7; PMID:21552268; <http://dx.doi.org/10.1038/nm.2366>
- Rusakiewicz S, Semeraro M, Sarabi M, Desbois M, Locher C, Mendez R, Vimond N, Concha A, Garrido F, Isambert N et al. Immune infiltrates are prognostic factors in localized gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res* 2013; 73:3499-510; PMID:23592754; <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-0371>
- Cameron S, Haller F, Dudas J, Moriconi F, Gunawan B, Armbrust T, Langer C, Füzesi L, Ramadori G. Immune cells in primary gastrointestinal stromal tumors. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2008; 20:327-34; PMID:18334877; <http://dx.doi.org/10.1097/MEG.0b013e3282f3a403>
- van Dongen M, Savage ND, Jordanova ES, Briaire-de Bruijn IH, Walburg KV, Ottenhoff TH, Hogendoorn PC, van der Burg SH, Gelderblom H, van Hall T. Anti-inflammatory M2 type macrophages characterize metastasized and tyrosine kinase inhibitor-treated gastrointestinal stromal tumors. *Int J Cancer* 2010; 127:899-909; PMID:20013807; <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.25113>
- Balachandran VP, Cavnar MJ, Zeng S, Bamboat ZM, Ocuin LM, Obaid H, Sorenson EC, Popow R, Ariyan C, Rossi F et al. Imatinib potentiates antitumor T cell responses in gastrointestinal stromal tumor through the inhibition of Ido. *Nat Med* 2011; 17:1094-100; PMID:21873989; <http://dx.doi.org/10.1038/nm.2438>
- Reiners KS, Topolar D, Henke A, Simhadri VR, Kessler J, Sauer M, Bessler M, Hansen HP, Tawadros S, Herling M et al. Soluble ligands for NK cell receptors promote evasion of chronic lymphocytic leukemia cells from NK cell anti-tumor activity. *Blood* 2013; 121:3658-65; PMID:23509156; <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2013-01-476606>
- Baumgartner JM, Palmer BE, Banerjee A, McCarter MD. Role of Melanoma Secreting Thrombospondin-1 on Induction of Immunosuppressive Regulatory T Cells through CD47. *J Cancer Mol* 2008; 4:145-52
- Lee HJ, Yeon JE, Suh SJ, Lee SJ, Yoon EL, Kang K, Yoo YJ, Kim JH, Seo YS, Yim HJ et al. Clinical utility of plasma glypican-3 and osteopontin as biomarkers of hepatocellular carcinoma. *Gut Liver* 2014; 8:177-85; PMID:24672660; <http://dx.doi.org/10.5009/gnl.2014.8.2.177>
- Semeraro M, Rusakiewicz S, Minard-Colin V, Delahaye NF, Enot D, Vely F, Marabelle A, Papoular B, Piperoglou C, Ponzoni M et al. Clinical impact of the NKp30/B7-H6 axis in high-risk neuroblastoma patients. *Sci Transl Med* 2015; 7:283ra55; PMID:25877893; <http://dx.doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa2327>
- Schlecker E, Fiegler N, Arnold A, Altevogt P, Rose-John S, Moldenhauer G, Sucker A, Paschen A, von Strandmann EP, Textor S et al. Metalloprotease-mediated tumor cell shedding of B7-H6, the ligand of the natural killer cell-activating receptor NKp30. *Cancer Res* 2014; 74:3429-40; PMID:24780758; <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-3017>
- Seliger B, Ritz U, Ferrone S. Molecular mechanisms of HLA class I antigen abnormalities following viral infection and transformation. *Int J Cancer* 2006; 118:129-38; PMID:16003759; <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.21312>
- Aboud M, Kingsmore S, Segal S. Role of natural killer cells in controlling local tumor formation and metastatic manifestation of different 3LL Lewis lung carcinoma cell clones. *Nat Immun* 1993; 12:17-24; PMID:8431660
- Smyth MJ, Thia KY, Street SE, MacGregor D, Godfrey DI, Trapani JA. Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. *J Exp Med* 2000; 192:755-60; PMID:10974040; <http://dx.doi.org/10.1084/jem.192.5.755>
- Imai K, Matsuyama S, Miyake S, Suga K, Nakachi K. Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet* 2000; 356:1795-9; PMID:11117911; [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)03231-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(00)03231-1)
- Desbois M, Rusakiewicz S, Locher C, Zitvogel L, Chaput N. Natural killer cells in non-hematopoietic malignancies. *Front Immunol* 2012; 3:395; PMID:23269924; <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2012.00395>
- Sconocchia G, Zlobec I, Lugli A, Calabrese D, Iezzi G, Karamitopoulou E, Patsouris ES, Peros G, Horcic M, Tornillo L et al. Tumor infiltration by FcγRIII (CD16)+ myeloid cells is associated with improved survival in patients with colorectal carcinoma. *Int J Cancer* 2011; 128:2663-72; PMID:20715106; <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.25609>
- Platonova S, Cherfils-Vicini J, Damotte D, Crozet L, Vieillard V, Validire P, Validire P, André P, Dieu-Nosjean MC, Alifano M et al. Profound coordinated alterations of intratumoral NK cell phenotype and function in lung carcinoma. *Cancer Res* 2011; 71:5412-22; PMID:21708957; <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-4179>
- Fregni G, Messaoudene M, Fourmentraux-Neves E, Mazouz-Dorval S, Chanal J, Maubec E, Marinho E, Scheer-Senyarich I, Cremer I, Avril MF et al. Phenotypic and functional characteristics of blood natural killer cells from melanoma patients at different clinical stages. *PLoS One* 2013; 8:e76928; PMID:24204708; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0076928>
- Mamessier E, Sylvain A, Thibault ML, Houvenaeghel G, Jacquemier J, Castellano R, Gonçalves A, André P, Romagné F, Thibault G et al. Human breast cancer cells enhance self tolerance by promoting evasion from NK cell antitumor immunity. *J Clin Invest* 2011; 121:3609-22; PMID:21841316; <http://dx.doi.org/10.1172/JCI45816>
- Carrega P, Morandi B, Costa R, Frumento G, Forte G, Altavilla G, Ratto GB, Mingari MC, Moretta L, Ferraraccio G. Natural killer cells infiltrating human non-small-cell lung cancer are enriched in CD56 bright CD16(-) cells and display an impaired capability to kill tumor cells. *Cancer* 2008; 112:863-75; PMID:18203207; <http://dx.doi.org/10.1002/cncr.23239>

30. Gannon PO, Poisson AO, Delvoye N, Lapointe R, Mes-Masson AM, Saad F. Characterization of the intra-prostatic immune cell infiltration in androgen-deprived prostate cancer patients. *J Immunol Methods* 2009; 348:9-17; PMID:19552894; <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2009.06.004>
31. Marechal R, De Schutter J, Nagy N, Demetter P, Lemmers A, Deviere J, Salmon I, Tejpar S, Van Laethem JL. Putative contribution of CD56 positive cells in cetuximab treatment efficacy in first-line metastatic colorectal cancer patients. *BMC Cancer* 2010; 10:340; PMID:20591136; <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2407-10-340>
32. Jin S, Deng Y, Hao JW, Li Y, Liu B, Yu Y, Shi FD, Zhou QH. NK cell phenotypic modulation in lung cancer environment. *PLoS One* 2014; 9:e109976; PMID:25299645; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0109976>
33. Remark R, Alifano M, Cremer I, Lupo A, Dieu-Nosjean MC, Riquet M, Crozet L, Ouakrim H, Goc J, Cazes A et al. Characteristics and clinical impacts of the immune environments in colorectal and renal cell carcinoma lung metastases: influence of tumor origin. *Clin Cancer Res* 2013; 19:4079-91; PMID:23785047; <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-3847>
34. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, Posati S, Rogaia D, Frassoni F, Aversa F et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 2002; 295:2097-100; PMID:11896281; <http://dx.doi.org/10.1126/science.1068440>
35. Ferrari de Andrade L, Ngiow SF, Stannard K, Rusakiewicz S, Kalimutho M, Khanna KK, Tey SK, Takeda K, Zitvogel L, Martinet L et al. Natural killer cells are essential for the ability of BRAF inhibitors to control BRAFV600E-mutant metastatic melanoma. *Cancer Res* 2014; 74:7298-308; PMID:25351955; <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-1339>
36. Pogge von Strandmann E, Simhadri VR, von Tresckow B, Sasse S, Reiners KS, Hansen HP, Rothe A, Böll B, Simhadri VL, Borchmann P et al. Human leukocyte antigen-B-associated transcript 3 is released from tumor cells and engages the NKp30 receptor on natural killer cells. *Immunity* 2007; 27:965-74; PMID:18055229; <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2007.10.010>
37. Reiners KS, Kessler J, Sauer M, Rothe A, Hansen HP, Reusch U, Hucke C, Köhl U, Dürkop H, Engert A et al. Rescue of impaired NK cell activity in hodgkin lymphoma with bispecific antibodies in vitro and in patients. *Mol Ther* 2013; 21:895-903; PMID:23459515; <http://dx.doi.org/10.1038/mt.2013.14>
38. Wu MR, Zhang T, Gacerez AT, Coupet TA, DeMars LR, Sentman CL. B7H6-Specific Bispecific T Cell Engagers Lead to Tumor Elimination and Host Antitumor Immunity. *J Immunol* 2015; 194:5305-11; PMID:25911747; <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1402517>
39. Cavnar MJ, Zeng S, Kim TS, Sorenson EC, Ocuin LM, Balachandran VP, Seifert AM, Greer JB, Popow R, Crawley MH et al. KIT oncogene inhibition drives intratumoral macrophage M2 polarization. *J Exp Med* 2013; 210:2873-86; PMID:24323358; <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20130875>
40. Chen LL, Chen X, Choi H, Sang H, Chen LC, Zhang H, Gouw L, Andtbacka RH, Chan BK, Rodesch CK et al. Exploiting antitumor immunity to overcome relapse and improve remission duration. *Cancer Immunol Immunother* 2012; 61:1113-24; PMID:22198309; <http://dx.doi.org/10.1007/s00262-011-1185-1>
41. Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, Wanders J, Kaplan RS, Rubinstein L, Verweij J, Van Glabbeke M, van Oosterom AT, Christian MC et al. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92:205-16; PMID:10655437; <http://dx.doi.org/10.1093/jnci/92.3.205>
42. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method. *Methods* 2001; 25:402-8; PMID:11846609; <http://dx.doi.org/10.1006/meth.2001.1262>



# Article 2: TNFR2/BIRC3-TRAF1 signaling pathway as a novel NK cell immune checkpoint in cancer

Dans cet article, nous avons étudié les mécanismes inhibiteurs des cellules NK par le microenvironnement tumoral. Notre équipe a démontré préalablement le rôle du récepteur NKp30 et de ses isoformes dans les GIST. Nous avons donc réalisé un *microarray* à partir des cellules NK CD56<sup>bright</sup> du sang et de la tumeur de 12 patients GIST, révélant 21 gènes surexprimés dans les cellules NK intratumorales des patients de mauvais pronostic clinique et/ou exprimant préférentiellement l'isoforme immunosuppressive NKp30C. Après analyse par RT-qPCR, 6 de ces gènes ont été confirmés comme surexprimés dans les cellules NK intratumorales. Parmi ces 6 gènes, 2 étaient surexprimés dans les tumeurs de patients de profil NKp30C : TRAF1 et BIRC3.

Ces gènes codent des protéines de la voie de signalisation de différents récepteurs de la famille des TNFRSF. Nous avons pu reproduire cette induction de TRAF1 et BIRC3 *in vitro* dans des cellules NK issues de volontaires sains (VS) par stimulation avec du TNF $\alpha$ . De plus l'activation des cellules NK de VS par stimulation du NKp30 ou du CD16 induisait également une surexpression de ces gènes. Nous avons démontré la spécificité de cette voie d'activation en bloquant le récepteur TNFR2 à l'aide d'un anticorps bloquant, induisant alors une diminution de la surexpression induite par le TNF $\alpha$ , le NKp30 ou le CD16. Ces résultats ont également été reproduits en utilisant des cellules NK issues du sang de patients atteints de mélanomes métastatiques (MM).

De manière intéressante, nous avons également observé que la surexpression des gènes TRAF1 et BIRC3 après stimulation des cellules NK par le TNF $\alpha$  (ainsi que par l'activation de NKp30 ou CD16) entraînait une diminution de l'expression du gène codant le récepteur activateur NCR1 (également appelé NKp46) chez les VS et MM via le TNFR2. Cette diminution de l'expression génique se retrouvait aussi dans l'expression membranaire de la protéine. De plus, seule l'expression du récepteur NCR1 était diminuée, l'expression d'autres récepteurs

activateurs comme le NKG2D restait inchangée. Ces résultats ont également été confirmés dans des cellules NK intratumorales issues de patients GIST.

Nous avons alors étudié l'impact des isoformes de NKp30 dans la modulation des gènes TRAF1, BIRC3 et NCR1. Comme nous l'avions déjà rapporté dans des études précédentes, les cellules NK de profil NKp30C produisaient moins de cytokines Th1 (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ ) que celles de profil NKp30AB. Cependant nous avons observé l'inverse lorsque les cellules NK étaient stimulées avec du TNF $\alpha$ . En revanche, les isoformes de NKp30 n'ont pas modulé l'expression des gènes TRAF1, BIRC3, NCR1, leur expression étant identique quel que soit le profil NKp30. Néanmoins, nous avons pu démontrer une corrélation négative entre le taux d'expression de BIRC3 et celui de NCR1 spécifiquement chez les cellules NK de profil NKp30C.

Finalement, nous avons testé l'effet du TNF $\alpha$  sur des cellules NK spléniques murines (le récepteur NKp30 n'étant pas exprimé chez la souris) et avons pu observer les mêmes effets que chez l'Homme avec une surexpression de TRAF1 et BIRC3 et une diminution de l'expression de NCR1. Ces résultats nous ont poussés à étudier le rôle de cette voie dans des modèles de tumeurs murines *in vivo*. Ainsi, nous avons greffé en sous-cutané des souris C57BL/6 avec la lignée RMA-S, une lignée tumorale déficiente en CMH I. Contrairement à nos prédictions, l'injection journalière de TNF $\alpha$  ou la neutralisation du TNFR2 par injection 3 fois par semaine d'un anticorps bloquant anti-TNFR2 murins n'ont pas modifié la croissance de cette tumeur n'exprimant pas de ligands de NCR1. Au contraire, l'inhibition du TNF $\alpha$  par injection d'Etanercept 3 fois par semaine, une protéine de fusion TNFR2-Fc, a induit une diminution du nombre de métastases pulmonaires de la lignée tumorale B16F10, décrite comme reconnue par le récepteur NCR1. Inversement, l'injection journalière de TNF $\alpha$  accélère la dissémination métastatique de cette même lignée tumorale dans les souris C57BL/6.

Notre étude indique donc que le TNF $\alpha$  joue un rôle immunosuppresseur pour les cellules NK, induisant une diminution de l'expression génique et membranaire du récepteur activateur NCR1 via la voie TNFR2/TRAF1/BIRC3. Le blocage du TNF $\alpha$  dans le microenvironnement est donc une cible thérapeutique potentielle pour restaurer les fonctions des cellules NK.

**TNFR2/BIRC3-TRAF1 signaling pathway as a novel NK cell immune checkpoint in cancer.**

Alexandre Ivagnès<sup>1,2,3</sup>, Meriem Messaoudene<sup>1,2</sup>, Gautier Stoll<sup>4,5,6,7</sup>, Bertrand Routy<sup>1,2,3</sup>, Aurélie Fluckiger<sup>1,2</sup>, Takahiro Yamazaki<sup>8</sup>, Kristina Iribarren<sup>4,5,6</sup>, Connie P. M. Duong<sup>1,2</sup>, Laetitia Fend<sup>9</sup>, Anne Caignard<sup>10,11</sup>, Isabelle Cremer<sup>4,6,7</sup>, Axel LeCesne<sup>1,12</sup>, Julien Adam<sup>1,13,14</sup>, Charles Honoré<sup>1,15</sup>, Olivier Mir<sup>1,12</sup>, Loïc Chaigneau<sup>16</sup>, Anne Berger<sup>6,17</sup>, Pierre Validire<sup>18,19</sup>, Christos Christidis<sup>6,19,20</sup>, Valérie Le Brun-Ly<sup>21</sup>, Mark J. Smyth<sup>22</sup>, Xavier Mariette<sup>3,23</sup>, Guido Kroemer<sup>4,5,6,7,24,25,26,27</sup>, Sylvie Rusakiewicz<sup>28</sup> and Laurence Zitvogel<sup>1,2,3,24\*</sup>.

<sup>1</sup> Institut de Cancérologie Gustave Roussy Cancer Campus (GRCC), 94805, Villejuif, France;

<sup>2</sup> INSERM U1015, GRCC, Villejuif, France;

<sup>3</sup> Université Paris Sud, Université Paris-Saclay, Faculté de Médecine, 94276, Le Kremlin Bicêtre, France;

<sup>4</sup> INSERM, U1138; Centre de Recherche des Cordeliers, 75006 Paris, France;

<sup>5</sup> Equipe 11 labellisée par la Ligue Nationale contre le Cancer, Centre de Recherche des Cordeliers, 75006 Paris, France;

<sup>6</sup> Université Paris Descartes/Paris V, Sorbonne Paris Cité, 15 rue de l'Ecole de Médecine, 75006 Paris, France ;

<sup>7</sup> Université Pierre et Marie Curie, 15 rue de l'Ecole de Médecine, 75006 Paris, France ;

<sup>8</sup> Department of Radiation Oncology, Weill Cornell Medical College, New York, NY, USA

<sup>9</sup> Transgene S.A., Illkirch-Graffenstaden, France

<sup>10</sup> INSERM, U1160, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

- <sup>11</sup> Institut Universitaire d'Hématologie, Hôpital Saint Louis, Paris, France
- <sup>12</sup> Département d'oncologie médicale, GRCC, Villejuif, France
- <sup>13</sup> Département d'anatomo-pathologie, GRCC, Villejuif, France;
- <sup>14</sup> INSERM U981, GRCC, Villejuif, France
- <sup>15</sup> Département de chirurgie, GRCC, Villejuif, France
- <sup>16</sup> Département d'oncologie médicale, Centre Hospitalier Universitaire Jean Minjot, Besançon, France
- <sup>17</sup> Département de chirurgie, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France
- <sup>18</sup> Département d'anatomo-pathologie, Institut Mutualiste Montsouris, Paris, France
- <sup>19</sup> Département d'oncologie médicale, Sarcome, Institut Mutualiste Montsouris, Paris, France
- <sup>20</sup> Département de chirurgie, Institut Mutualiste Montsouris, Paris, France
- <sup>21</sup> Département d'oncologie médicale, Centre hospitalier régional universitaire de Limoges Dupuytren, Limoges, France
- <sup>22</sup> Immunology in Cancer and Infection Laboratory, QIMR Berghofer Medical Research Institute, Herston, Queensland, Australia
- <sup>23</sup> INSERM UMR 1184, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Service de Rhumatologie, Hôpitaux Universitaires Paris-Sud, Le Kremlin Bicêtre, France
- <sup>24</sup> Centre d'investigation clinique en biothérapie des cancers (CICBT) 1428, Villejuif, France
- <sup>25</sup> Pôle de Biologie, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France
- <sup>26</sup> Plateforme de métabolomique et de biologie cellulaire, GRCC, 94805 Villejuif, France;
- <sup>27</sup> Karolinska Institute, Department of Women's and Children's Health, Karolinska University Hospital, 17176 Stockholm, Sweden;

<sup>28</sup> Center of Experimental Therapeutics, Ludwig Center for Cancer Res, Department of Oncology, University of Lausanne, Lausanne 1011, Switzerland

Key words: NK cells, cancer, immunity, immune checkpoint, TNF $\alpha$ , BIRC3, TRAF1

**Abbreviations:**

NK: Natural Killer

PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cell

ILC1: Innate Lymphoid Cell 1

TME: Tumor Microenvironment

TNF $\alpha$ : Tumor Necrosis Factor  $\alpha$

IFN $\gamma$ : Interferon  $\gamma$

TGF $\beta$ : Transforming growth factor  $\beta$

NKp30/NCR3: Natural Killer Cell P30-Related Protein/ Natural Cytotoxicity Triggering Receptor 3

NKp46/NCR1: Natural Killer Cell P46-Related Protein/ Natural Cytotoxicity Triggering Receptor 1

mAb: monoclonal Antibody

TIL: Tumor Infiltrating Lymphocyte

BIRC3: Baculoviral IAP Repeat Containing 3

cIAP2: Cellular Inhibitor of Apoptosis 2

TRAF1: TNF Receptor Associated Factor 1

TNFR2: TNF Receptor 2

HV: Healthy Volunteer

MM: Metastatic Melanoma patient

GIST: Gastrointestinal Stromal Tumor

IL-12: Interleukin-12

IL-10: Interleukin-10

IL-33: Interleukin-33

Th1: T helper cells 1

CTLA-4: Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4

PD-1: Programmed cell death protein 1

PD-L1: Programmed death-ligand 1

TIM3: T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3

KIR: Killer-cell immunoglobulin-like receptor

CD94/NKG2A: Cluster of Differentiation 94/ Killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 1

TIGIT: T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains

Cbl-b: Casitas B-lineage lymphoma-b

CDK8: Cyclin-dependent kinase 8

GSK3: Glycogen synthase kinase 3

CIS: Cytokine-Inducible SH2-containing protein

4-1BB/CD137/TNFRSF9: Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily Member 9

Fas: Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily Member 6

FADD: Fas-Associated protein with Death Domain

TRAD: Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein

TRAIL: Tumor-necrosis-factor Related Apoptosis Inducing Ligand

HCV: Hepatitis C Virus

NF- $\kappa$ B: Nuclear Factor-kappa B

GrzA: Granzyme A

### **Acknowledgements and Funding**

GK and LZ were supported by the Ligue Nationale contre le Cancer (Equipes labellisées), Agence Nationale pour la Recherche (ANR AUTOPH, ANR Emergence), European Commission (ArtForce), European Research Council Advanced Investigator Grant (to GK), Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), Institut National du Cancer (INCa), Fondation de France, Cancéropôle Ile-de-France, Fondation Bettencourt-Schueller, Swiss Bridge Foundation, the LabEx Immuno-Oncology, the SIRIC Stratified Oncology Cell DNA Repair and Tumor Immune Elimination (SOCRATE); the SIRIC Cancer Research and Personalized Medicine (CARPEM), and the Paris Alliance of Cancer Research Institutes (PACRI). LZ, GK are all sponsored by Association pour la Recherche contre le Cancer (PGA120140200851) and ISREC Foundation. MJS was supported by a National Health and Medical Research Council of Australia Research Fellowship (1078671).

### **Conflicts of interests**

LZ is on the administrative board of Transgene and GK and LZ are co-founders of EverImmune.

### **\*Corresponding author's Information:**

Pr. Laurence ZITVOGEL

Gustave Roussy Cancer Campus

114 rue Edouard Vaillant

94805 VILLEJUIF Cedex

France

E-mail: [laurence.zitvogel@gustaveroussy.fr](mailto:laurence.zitvogel@gustaveroussy.fr)

Phone: +33 1 42 11 50 41

Fax: +33 1 42 11 60 94



## Abstract

Natural Killer (NK) cells control metastatic dissemination of murine tumors and are an important prognostic factor in several human malignancies. However, tumor cells hijack many of the NK cell functional features compromising their tumoricidal activity. Here, we show a deleterious role of the TNF $\alpha$ /TNFR2/BIRC3/TRAF1 signaling cascade in NK cells from the tumor microenvironment (TME). TNF $\alpha$  induces BIRC3/cIAP2 transcripts and reduces NKp46/NCR1 transcription and surface expression on NK cells, promoting metastases dissemination in mice and poor prognosis in GIST patients. NKp30 engagement, by promoting the release of TNF $\alpha$ , also contributes to BIRC3 upregulation, and more so in patients expressing predominantly NKp30C isoforms. These findings reveal that in the absence of IL-12 or a Th1-gearred TME, TNF $\alpha$  can be considered as a negative regulatory cytokine for innate effectors.

## Introduction

The interactions between the immune system and cancer cells are governed by a complex network of biological pathways, resulting in an overriding tolerance. Tolerance is maintained by multiple mechanisms, including regulatory immune cells, immunosuppressive cytokines and chemokines, and “immune checkpoint” receptors that down-modulate antitumor immune functions. The CTLA-4/B7.2 and PD-1/PD-L1 receptor/ligand pairs are dominant immune checkpoint axis operative in the tumor microenvironment (TME), co-opted by cancers to evade immune attack<sup>1</sup>. Monoclonal antibodies (mAbs) blocking these pathways have emerged as powerful weapons in the oncologic armamentarium to harness T cell effectors and/or decrease regulatory T cell functions<sup>2-4</sup>. However, sequenced therapy targeting first NK cells and then T cells might be considered, given that tumor cell attack and IFN $\gamma$  release by NK cells foster the TME conducive/contributing to the development of antigen-specific T cell- based immune responses<sup>5,6</sup>.

Despite the discovery of the ‘natural killing’ capacity of NK cells 40 years ago, NK cell function has not yet been successfully exploited in the clinic. NK cells are a heterogeneous population comprising cytotoxic, immunoregulatory, memory and unlicensed-licensed subsets.

Substantial interspecies differences, relative lack of proliferative capacity *in vivo*, evidence that early cross-talk with myeloid suppressor cells facilitates the metastatic niche, limited homing capacities to tumor beds and dysfunction at tumor sites represent crucial hindrances for their clinical implementation<sup>7</sup>.

The balance between activating and inhibitory receptors on NK cells determines the activation status of NK cells. Abolishing the inhibitory signals of NK cells by means of blocking monoclonal antibodies (mAbs) supposedly restore full-blown NK cell activity. Hence, blocking mAbs directed against CTLA-4, PD-1, PDL-1, Tim3 and KIR not only unleash T cell functions but also NK cell activity to various degrees<sup>8-13</sup>.

More importantly, apart from the killer inhibitory receptors and the CD94/NKG2A pathway which are currently targeted in clinical trials<sup>14</sup>, only a few other NK cell specific (or non-specific) immune checkpoints have been described, mostly in the context of mouse tumor immunosurveillance (such as CD96<sup>15</sup>, TIGIT<sup>16</sup>, and the Cbl-b<sup>17</sup>, CDK8<sup>18</sup>, GSK3<sup>19</sup>, CIS<sup>20,21</sup> signaling cascades). In addition, these immune checkpoints do not alone explain all dysfunctional capacities of NK tumor infiltrating lymphocytes (TILs), suggesting that additional inhibitory molecules may be in play in dampening NK cell functions.

Therefore, there is a need for a deeper understanding of the most relevant immune checkpoints operating in human solid malignancies. The TME offers several complementary mechanisms accounting for NK cell dysfunctions (among which TGF $\beta$ , adenosine, IL-10 and metalloproteinases shedding ligands for activating receptors<sup>7</sup>). We and others have reported in frequent and paradigmatic adult and pediatric malignancies (lung cancers, melanoma, neuroblastoma and gastrointestinal sarcomas) that NK cell functional deficiencies dictate poor prognosis<sup>22-29</sup>.

Our group unraveled the important role of the activating receptor NKp30 and more importantly, NKp30 isoforms in the regulation of NK cell functions, in B7-H6 (NKp30 ligand) expressing neuroblastoma<sup>24,30</sup> and GIST<sup>25-28,31</sup>. We described the immunosuppressive NCR3/NKp30C isoform expressed by less than 50% individuals, unleashing IL-10 production by NK cells (in contact with dendritic cells) and defects in TNF $\alpha$  release<sup>27</sup>, whilst other patients present a dominant NKp30AB phenotype associated with Th1 and lytic functions. GIST patients

with dominant NKp30C transcription were endowed with poor prognosis<sup>27</sup>. We took advantage of the GIST model system in which both NK cells and NKp30 isoforms display a pathophysiological relevance in patients to scrutinize which inhibitory pathways could be associated with TIL NK cell dysfunctions. Surprisingly, we unraveled a deleterious role of the TNF $\alpha$ /TNFR2/BIRC3/TRAF1 signaling pathway, inducing the downregulation of Ncr1 gene transcription and NKp46 surface expression correlating with NKp30C patient' profiling. These findings could be validated across species since TNF $\alpha$  also induced a marked increase and reduction of Birc3 and Ncr1 genes transcription respectively and tended to facilitate metastases dissemination in the B16F10 mouse melanoma model.

## Results

### Regulation of Birc3/cIAP2 and Traf1 gene transcripts in NK TILs in GIST patients

We performed flow cytometry based-cell sorting of the CD3<sup>-</sup>CD56<sup>bright</sup> NK cell subset in peripheral blood as well as paired GIST tumors at diagnosis of 12 patients, for whom the NKp30 isoform profiling (AB versus C<sup>26</sup>) and clinical prognosis (time to progression after imatinib mesylate) were characterized and monitored (Suppl. Table 1). The transcriptional landscape of these NK cell subsets was analyzed by Agilent-based DNA microarrays and statistical analyses were performed, attempting to select gene products mostly overexpressed in tumor beds (rather than blood), in cases of poor (rather than favorable) prognosis as well as in NKp30C (rather than AB) isoform profiles (Fig. 1A-B, Suppl. Fig. 1). Twenty one gene candidates were statistically significant but after specific probe-based qPCR analyses, only 6 gene products overexpressed in tumors and in poor prognosis patients (early relapse and NKp30C profiling) were retained in this model (Fig. 1C). Among these candidates, baculoviral IAP repeat containing 3 (BIRC3, also called cIAP2) and tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factor 1 (TRAF1) were the strongest hallmarks of NK TILs associated with NKp30C unfavorable profile (Fig. 1D). Of note, these two parameters were positively correlated (Fig. 1E). Traf1 was also under expressed in GIST presenting

with a mutation in the exon 11 of c-kit (known to be of better prognosis) (Suppl. Fig. 1).

Altogether, these microarray analyses point to a potential regulatory role of the cIAP2/BIRC3 - TRAF1 signaling pathway in NK GIST TILs.

### **Regulation of Birc3/Traf1 gene expression in NK cells**

TRAF1/2 and cIAP1/2 are members of the TNF receptor associated factor (TRAF) and the inhibitor of apoptosis (IAP) families, respectively. They are critical for both the TNF $\alpha$ -induced canonical and the non-canonical NF- $\kappa$ B signaling pathways<sup>32,33</sup>. We investigated which of the TNFR family members could lead to the coordinated transcription of both Birc3/cIAP2 and Traf1 gene products in human circulating NK cells of healthy volunteers (HV) (Fig. 2A-B, Suppl. Fig. 2A), in NK cell lines (Suppl. Fig. 2B) and in NK cells from melanoma patients (MM) (Fig. 2C). We found that TNF $\alpha$  (but not engagement of CD137/4-1BB or CD95/Fas, other receptors of the TNF receptors superfamily expressed by the NK cells) selectively induced an increased transcription of Birc3/cIAP2 and Traf1 gene products, in all conditions (except in NKL, Suppl. Fig. 2B). Moreover, triggering of NKp30 or CD16 NK cell activating receptors increased the levels of mRNA encoding BIRC3 and TRAF1 in NK from HV and MM (Fig. 2A-C). Given that engagement of NK cell activating receptors releases TNF $\alpha$ , it is not surprising to observe that blockade of binding and signaling through TNFR2 using neutralizing antibodies anti-TNFR2 tend to reduce the NKp30-mediated upregulation of Birc3 and Traf1 transcripts (Fig. 2B). Of note, both NK cells subsets differing for CD56 expression levels (CD56<sup>dim</sup> vs CD56<sup>bright</sup>) responded equally to TNF $\alpha$  stimulation via upregulation of Birc3 and Traf1 mRNA (Suppl. Fig. 2C). Finally, both Birc3 and Traf1 gene products induced by TNF $\alpha$  (Fig. 2D) or NKp30 cross-linking (Fig. 2E) were highly correlated in circulating NK cells from HV and MM patients.

### **TNF $\alpha$ induced downregulation of NCR1/NKp46 in NK cells**

Interestingly, stimulation of human NK cells with TNF $\alpha$  or engagement of NK cell

activating receptors (such as NKp30 or CD16) not only upregulated the transcription of *Birc3* and *Traf1* gene products but concomitantly downregulated the activating receptor NKp46 in HV (Fig. 3A) and MM (Fig. 3B) in a  $\text{TNF}\alpha/\text{TNFR2}$ -dependent manner (Suppl. Fig. 3A-B). This was observed regardless of CD56 expression (Suppl. Fig. 3C) and with NK92 cell line (Suppl. Fig. 3D). In contrast to  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{TGF}\beta$  failed to downregulate the levels of mRNA encoding NCR1/NKp46 (Fig. 3C, right panel) and did not boost the  $\text{TNF}\alpha$ -mediated effects. We failed to observe any  $\text{TNF}\alpha$ -dependent NK cell death or anti-proliferative effects (Suppl. Fig. 4), or inhibition of  $\text{IFN}\gamma$  secretion (Fig. 4B). Moreover, at the protein level,  $\text{TNF}\alpha$  tended to induce a slight but significant decrease in surface expression of NKp46, on the whole NK cell population (Fig. 3E, upper panel) and on  $\text{CD56}^{\text{dim}}$  but more markedly on  $\text{CD56}^{\text{bright}}$  NK cells (Fig. 3D, Suppl. Fig. 3E), as also observed with  $\text{TGF}\beta$  on  $\text{CD56}^{\text{dim}}$  NK cells ( $p=0.03$ ; Suppl. Fig. 3E). Also, overlay of one representative HV shows that  $\text{TNF}\alpha$ -induced down regulation of NCR1 is dose dependent (Fig. 3E, lower panel). Of note,  $\text{TNF}\alpha$  failed to regulate other important activating receptors (such as NKG2D, Suppl. Fig. 2D) or immune checkpoints (such as PD-1, not shown).

We next investigated the impact of the NKp30 isoform profiling in the  $\text{TNF}\alpha$ -dependent regulation of BIRC3/TRAF1 and NCR1/NKp46 in circulating NK cells from HV. While NKp30-dependent stimulation of NK cells from NKp30C individuals led to lower Th1 cytokine secretion compared with NKp30AB profiles (Fig. 4A) as already reported<sup>27</sup>, we obtained the opposite result using  $\text{TNF}\alpha$  stimulation of NK cells (Fig. 4B). Next, we observed that both NKp30 isoform profiles did respond to  $\text{TNF}\alpha$  stimulation for *Birc3*/*Traf1* genes upregulation as well as *Ncr1* gene downregulation (Fig. 4C). Of note, there was a strong inverse correlation between BIRC3 and NCR1/NKp46 encoding transcripts ( $p=0.00012$ ; not shown), but this is attributable to individuals harboring a NKp30C isoform profile (Fig. 4D).

Subsequently, we studied the effects of  $\text{TNF}\alpha$  on tumor infiltrating lymphocytes (TILs) from GIST patients. In three independent cases, this cytokine could also induce *Traf1* transcripts but less consistently *Birc3* counterparts (Fig. 5A). NKp30 engagement of those TIL NK cells appeared to mimic the effects of  $\text{TNF}\alpha$  in the one available GIST case (Fig. 5B). In parallel, we observed a downregulation of *Ncr1* gene transcription (Fig. 5C) and protein expression on these TIL NK cells (Fig. 5D).

## **The TNF $\alpha$ /TNFR2 pathway promotes aggressiveness of NK cell-dependent tumors**

We investigated the capacity of TNF $\alpha$  to regulate the expression of Birc3 and Traf1 genes in murine splenic NK cells. Here again, as in human cells, the exposure of mouse NK cells to TNF $\alpha$  enhanced the levels of both transcripts and decreased that of Ncr1 (Fig. 6A). To address the relevance of these findings, we treated RMA-S, a TAP2-deficient  $\beta$ 2 microglobulin negative lymphoma under the control of NK cells<sup>34</sup>, with TNF $\alpha$  or a neutralizing anti-mouse TNFR2 Ab. None of these manoeuvres could interfere with the growth of this s.c. lymphoma which fails to express NCR1 ligands (Suppl. Fig. 5). In sharp contrast, Etanercept, a TNFR2-Fc fusion protein (but not Anakinra, blocking IL-1R1, not shown) reduced the number of metastases from B16F10 melanoma known to be controlled through NCR1/NKp46 receptors in C57BL/6 mice (Fig. 6B-C)<sup>35</sup>. Conversely, while administrations of the cytokine TNF $\alpha$  twice a week did not have any prometastatic effects (not shown), daily doses of recombinant TNF $\alpha$  accelerated metastases dissemination (Fig. 6B-C).

These findings suggest that TNF $\alpha$  may act as a protumorigenic cytokine in NCR1-dependent tumor models.

## **Discussion**

The bottom-up strategy consisting of transcriptomic analyses of TIL NK cells from poor prognosis patients (relative to good prognosis counterparts), and selecting for gene products overexpressed in TIL compared with paired blood specimen revealed two molecular components belonging to the TNFR signaling pathway, i.e. BIRC3/cIAP2 and TRAF1. This finding culminated in the demonstration that TNF $\alpha$  is the main regulator of the expression of both molecules, and leads in turn in the downregulation of the main NK cell activating receptor NCR1/NKp46 expected to keep in check tumor progression.

Tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor (TRAF) 1 was originally identified based on its ability to interact with the cytosolic domain of TNF receptor type 2 (TNFR2)<sup>36</sup>. TRAF1 in fact associates with multiple TNFR family members and can also bind several protein kinases and adaptor proteins suggesting that TRAF1 likely possesses multiple functions in cytokine signaling networks. TRAF1 is unique among TRAF proteins for two reasons. First, it lacks a RING finger domain present in TRAF2-6 that has been shown to be required for TRAF2- and TRAF6-mediated activities. Second, TRAF1 has the most restricted expression among TRAFs, and is found almost exclusively in activated lymphocytes, dendritic cells, and certain epithelia.

The biology of TRAF1 is complex, TRAF1 exhibiting multifaceted functions<sup>37</sup>. Notably, TRAF1 associates with TRAF2 to interact with TNFR2, the TRAF1-TRAF2 heterodimers inactivating TNFR2 activities. TRAF1 expression is induced after NF- $\kappa$ B activation, and therefore could participate in the negative feedback loop to suppress TNFR2-induced NF- $\kappa$ B activity. Recent evidence obtained from TRAF1<sup>-/-</sup> mice show that TRAF1-deficient T cells are hyper-responsive to TNF $\alpha$ , exhibiting increased T cell receptor (TCR)-dependent T cell proliferation in vitro. Also, these TRAF1<sup>-/-</sup> mice had increased sensitivity to TNF $\alpha$ -induced skin necrosis in vivo. This initial report supported a role for TRAF1 as a negative regulator of signaling by certain TNF-family receptors.

Additional complexity in TRAF1 biology came from compelling evidence of its pro- and anti-apoptotic functions. The caspase inhibitors cIAP2/BIRC3 and FLIP (which are NF- $\kappa$ B dependent) also bind to TRAF1 and TRAF2, and can be recruited to the TNFR1 receptors through interaction with FADD, FADD/TRADD complexes leading to caspase 8-dependent apoptosis. Hence, TRAF1 can be converted into a pro-apoptotic protein after cleavage of caspase 8, after cell stimulation with FasL or TNF $\alpha$ <sup>38,39</sup>. However, results obtained in TRAF1 transgenic mice showed that TRAF1 suppress TCR (or Fas and TNFR1)-mediated apoptosis<sup>40</sup>. The balance between pro-apoptotic (FADD/casp8) and anti-apoptotic (TRAF1/TRAF2/cIAP1/cIAP2) complexes that are recruited to TNFR1 induce either gene expression or apoptosis. This flip-flop phenotype of TRAF1 might depend upon i) which protein TRAF1 binds to, ii) status of TRAF1 (cleaved or not by casp-

8), iii) member of TNF-family receptors that TRAF1 interact with at a given time point, knowing that some are stimulatory<sup>41</sup> and some are inhibitory<sup>42,43</sup>.

Here we show that TNFR2/TRAF1/c-IAP2 signaling is associated with an NK cell suppressive phenotype. It is not related to the pro-or anti-apoptotic effects of TRAF1 but may be related to its interference on cytokine signaling. Several mechanisms pertaining to the intrinsic role of TNF $\alpha$  or to NF- $\kappa$ B activation could be in play.

NK cell activation, notably through NKp30 engagement or exposure to TNF $\alpha$ , leads to rapid activation of the canonical pathway explaining the congenital NK cell immunodeficiency related to mutations of the NF- $\kappa$ B essential modulator (NEMO) gene<sup>44</sup>. However, NF- $\kappa$ B nuclear translocation in NK cells is not always associated with Th1-like NK cell activating pathways. Indeed, IL-33 produced by decidual stromal cells, by transducing a ST2-specific triggering of decidual NK cells induced a Th2-like polarization (IL-4, IL-13, IL-10) associated with a loss of perforin/GrzA and imbalanced expression of activating (NCR)/inhibitory (KIR) NK receptors, all culminating in an immunosuppressive cross-talk<sup>45</sup>. This is reminiscent of the differential signaling pathways involved in NF- $\kappa$ B nuclear translocation contrasting NKp30C versus NKp30AB NK cell profiles, which might explain stronger association of cIAP2/BIRC3 with NKp30C phenotypes. It appears indeed from our data that TNF $\alpha$ -exposed NK cells from NKp30C individuals produce more IFN $\gamma$  (and perhaps more TNF $\alpha$ ) in a positive feedback loop than those from NKp30AB individuals, leading to chronic TNF $\alpha$  production (instead of a 'desirable' short term apoptosis), maintaining the immunosuppressive NK cells.

The prevailing conundrum is that TNF $\alpha$  augments cytokine-induced NK cell IFN $\gamma$  production through TNFR2<sup>46</sup> which is supported by the decreased activation of NK cells observed in patients exposed to anti-TNF Abs<sup>47</sup>. This TNF $\alpha$ -induced NK cell activation can culminate in apoptotic NK cell death as reported in pioneering reports exposing NK cells to IL-2/IL-12<sup>48</sup>. However, in the setting of chronic inflammation such as Crohn disease<sup>49</sup>, or HCV –induced liver fibrosis, a high TNF $\alpha$  production by activated NK cells or innate lymphoid cells contrasted with low IFN $\gamma$  release and was associated with tissue destruction. Hence, TNF $\alpha$  production by NKp44<sup>+</sup> liver NK cells in HCV induced-hepatitis markedly correlated with fibrosis activity and viral load<sup>50</sup>. This NKp44/NKp44L-mediated, TNF $\alpha$ -dependent profibrotic phenotype contrasted with the



NKG2D-mediated, IFN $\gamma$ /TRAIL-dependent antifibrotic activity of NKp46<sup>high</sup> NK cells described during chronic HCV infection<sup>51,52</sup>. So, it is conceivable that NK cell TNF $\alpha$  production may participate in chronic inflammation during oncogenetic processes, such as those described in GIST.

Moreover, recent findings from Smyth's group indicated that TGF $\beta$  favors the dedifferentiation of conventional effector NK cells into TNF $\alpha$  producing ILC-1 which display an immature phenotype associated with a poor tumoricidal activity (Gao Y, Smyth MJ, Nat Immunol, in press).

Lastly, the reduced surface expression of NKp46 expression resulting from direct or indirect exposure to TNF $\alpha$  could also mitigate NK cell effector functions. The NKp46 receptor was demonstrated to be essential for the *in vitro* functionality of NK cells<sup>53</sup> and, consequently, was suggested to be crucial to the *in vivo* immunity conferred by NK cells against tumors and viruses<sup>35,54</sup>. The level of NKp46 expressed on the NK cell surface is associated with the magnitude of the response elicited upon ligation<sup>53</sup>. Most of the receptor downregulation has been associated with the NKp46 engagement by NKp46 ligands expressed on tumor cells or virus- infected targets<sup>35,55</sup>. Additionally, decreased NKp46 expression independent of NKp46 engagement have been described in the setting of HIV infection and CD16 triggering in a process involving metalloproteinase activation<sup>56</sup>, also culminating into impaired NK cell functions.

While high dosing of local TNF $\alpha$  can promote necrosis, chronic exposure to low dosing could blunt the innate arm of anticancer immune responses and favor fibrosis. While anti-TNF $\alpha$  antibodies were associated with occurrence of cancers (melanoma or lymphoma<sup>57</sup>), the results of meta-analyses were never clear, maybe in relation with the complexity of the TNFR2/TRAF1 signaling pathways. We can postulate that genomic differences in this pathway may also explain the variegated functional outcome observed post-TNF $\alpha$  stimulation or TNFR2 blockade. Recent genome-wide association studies disclosed that several single nucleotide polymorphisms (SNPs), including tumor necrosis factor (TNF) alpha -308G/A polymorphism<sup>58</sup> and TNF receptor-associated factor 1 (TRAF1) (+16860A/G), are associated with the pathophysiology of rheumatoid arthritis (RA) or non-hodgkin lymphoma<sup>59-61</sup>. Recently, Abdul-Sater et al. unveiled an unexpected role for TRAF1 in negatively regulating Toll-like receptor signaling, providing a mechanistic explanation for the increased inflammation seen with a disease-associated TRAF1 SNP. The

TRAF1 MATH domain binds directly to three components of the linear ubiquitination (LUBAC) complex, SHARPIN, HOIP and HOIL-1, to interfere with the recruitment and linear ubiquitination of NEMO in monocytes. This results in decreased NF- $\kappa$ B activation and cytokine production, independently of TNF $\alpha$ <sup>62</sup>. Hence, Traf1<sup>-/-</sup> mice show increased susceptibility to LPS-induced septic shock. The decreased TRAF1 protein in subjects with the RA-associated SNP (GG) in the 5' intron is explained by decreased pre-mRNA levels of the G allele compared to the A allele. Monocytes and T cells from healthy human subjects harboring an RA-associated SNP in TRAF1 express less TRAF1 pre-mRNA and protein following activation. Regardless of this effect on monocytes which was TLR4-dependent but TNF $\alpha$ -independent, TRAF1 genotyping was assessed as a potential genetic predictor of the response to anti-TNF Abs in Japanese RA patients. TRAF1 (+16860A/G) SNP and more specifically the risk allele GG of rs3761847 (found in 25% of Caucasians) appeared to be a good predictor of resistance to TNF $\alpha$  blockers in RA patients<sup>63</sup>.

In conclusion, this manuscript highlights for the first time the immunosuppressive functions of TNF $\alpha$ -mediated signaling in NK cells in tumor beds, maintained as an autocrine loop in NKp30C profiled individuals, culminating in chronic TNF $\alpha$  release, NKp46 downmodulation and perhaps, dedifferentiation in ILC1 cells. This work also highlights the potential relevance of TRAF1 proteins, not only in T cell and monocyte biology but also in NK cell functions. The genetic patterns of TRAF1 deserve to be studied prospectively to better evaluate the potential of TNF $\alpha$  blockade in restoring cancer immunosurveillance.

## Material and Methods

**Patients and specimens.** GIST samples were provided by Gustave Roussy Cancer Campus (Villejuif, France), European Hospital Georges Pompidou (Paris, France) and Hospital Jean Minjot (Besançon, France). Patients' characteristics are depicted in Suppl. Table 1. The study was approved by the local ethical committee (2007-A00923-50) and informed written consent was obtained from patients. Blood samples of melanoma patients were collected during the MAGE3-protein vaccination trial. The details about patient characteristics, protocol description, and survival

have been previously reported by Kruit and colleagues<sup>64</sup>. PBMCs of healthy volunteer (HV) were obtained from buffy coat provided by the Etablissement Français du Sang (EFS, Créteil, France).

**NK cell lines.** Human NK leukaemia cell line NKL was a gift of Pr I. Cremer (Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France). NK92 cell line was obtained from ATCC. YTS was kindly provided by Dr A. Caignard (Institut Universitaire d'Hématologie, Paris, France) and MEC04 was a gift from Dr P. Coppo (Hôpital Saint-Antoine, Paris, France).

**Tumor infiltrated lymphocyte (TIL) preparations.** Resected GIST specimens were dissociated with the gentle MACs Dissociator protocol (Miltenyi Biotec) as previously described<sup>26</sup>. Briefly, tissue samples were cut and placed in dissociation medium, which consisted of RPMI1640 (GIBCO, Invitrogen), 1% penicillin/streptomycin, collagenase IV (100IU/mL), hyaluronidase (280IU/mL), and DNase I (30IU/mL) (all from Sigma-Aldrich), and run on a gentle MACS Dissociator (Miltenyi Biotec). The tumor cell suspension was filtered through a 70 µm cell strainer (BD Biosciences), centrifuged for 5 minutes at 1500 rpm and TILS was estimated in Malassez cell by Hayem Blue staining.

**Flow cytometry analyses and NK cell isolation.** GIST tumor cell suspensions were stained with conjugated antibodies CD45-APC-750 (clone J33), CD56-PC7 (clone N901, both from Beckman Coulter), CD3-VB (clone BW264/56, Miltenyi Biotec), and the dead cell exclusion 7-AAD (BD Pharmingen) for 20 minutes at 4°C, then washed with PBS. Next, NK cells defined as CD45<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup>CD56<sup>bright</sup> were sorted by a FACS ARIA III (BD Biosciences). PBMC were stained with the same CD56-PC7 and CD3-VB, NKp46-APC (clone 9E2, Miltenyi) or the corresponding isotype control mouse IgG1 (clone IS5-21F5, Miltenyi Biotec). Cells were then washed, fixed, and acquired by flow cytometry using a Cyan ADP9, (Beckman Coulter Inc.) within 24 h. Data were analyzed with Kaluza software (Beckman Coulter Inc.).

PBMC of Healthy Volunteer (HV) were obtained from buffy coat provided by the Etablissement Français du Sang (EFS, Créteil, France) using lymphocytes separation medium (Eurobio, AbCys), washed three times in PBS 1X. NK cells were then isolated using magnetic negative selection kits following the manufacturer's instructions (EasySep, Stemcell Technologies).

NK cells from mice were obtained after sampling of the spleen which was crushed on the 100µm cell strainer, red blood cells were eliminated using ACK solution (Ammonium-Chlorure-Potassium) and NK cells were then negatively selected using magnetic separation kit according to the manufacturer's instructions (mouse NK Cell isolation kit, Miltenyi Biotec).

**Microarray analysis.** 250 ng of cDNAs of CD3<sup>-</sup>CD56<sup>bright</sup> NK cells from each GIST patient were used as template for Cy3 labeling which was performed according to Miltenyi Biotec's undisclosed protocol. The Cy3- labeled cDNAs were hybridized overnight (17 h, 65°C) to an Agilent Whole Human Genome Oligo Microarrays 8x60K V2 using Agilent's recommended hybridization chamber and oven. Fluorescence signals of the hybridized Agilent Microarrays were detected using Agilent's Microarray Scanner System (Agilent Technologies). The Agilent Feature Extraction Software (FES) was used to read out and process the microarray image files. Expression is normalized by row (reduced and centered). Genes are selected according to overexpression (p-value and Fold-Change of differential tests according to different annotation, computed from "ebayes" function applied to "lmFit" of limma package<sup>65</sup>).

**In vitro stimulation.** NK cells were seeded in 96-well plates at  $1 \times 10^5$  cells/well in 200 µL of complete RPMI1640 (GIBCO Invitrogen) +10% human AB serum (Institut de biotechnologies Jacques Boy). For NKp30 cross-linking, flat bottom plates (Maxisorp, Nunc) were pre-coated with 2.5 µg/mL of either anti-human NKp30 antibody (Clone 210847, R&D Systems) or the corresponding IgG2A isotype control (Clone 20102, R&D Systems) in 50 µL of Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS, GIBCO Invitrogen). For TNFα (Miltenyi Biotec) and TGFβ (R&D Systems) stimulation, NK cells were seeded in 96-round bottom plates and cytokines were added in the medium at indicated concentration. Blocking of the TNFR2 was obtained using the

anti-human TNFR2 antibody (Clone 22210, R&D Systems) or the corresponding IgG1 isotype control (Clone 11711, R&D Systems). Fas agonist antibody (Clone UT-1) and its mouse isotype control IgM (Clone PFR-03) were obtained from Invitrogen. 4-1BB agonist antibody was kindly provided by Pr. Byoung S. Kwon (Tulane University Health Sciences Center, LA, USA) and its isotype control IgG1 was obtained from R&D Systems. For RNA analysis, cells were harvested 12 h after stimulation, washed with PBS and re-suspended in RLT buffer containing  $\beta$ -2 mercaptoethanol (Quiagen) to preserve the RNA quality and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . For cytometry analysis, cells were harvested after 48 h of stimulation, washed with PBS 1X and stained as described above. Cytokines were measured from 24 h in vitro culture supernatants by ELISA kit according to the manufacturers' instructions:  $\text{TNF}\alpha$  (BD OptEIA 555212, BD Biosciences),  $\text{IFN}\gamma$  (ELISA MAX 430103, Biolegend),  $\text{TGF}\beta$ 1 (BD OptEIA, 559119, BD Biosciences).

**Quantitative reverse-transcription PCR (qRT-PCR).** Total cellular RNA was isolated from samples with the RNeasy kit (Qiagen) following the manufacturer's recommendations. For NKp30 detection, first strand cDNA was synthesized from 1  $\mu\text{g}$  of total RNA using SuperScript<sup>TM</sup> III Reverse Transcriptase (Invitrogen) and random primers (Promega) according to the manufacturer's recommendations. For qRT-PCR, 5  $\mu\text{L}$  of first-strand cDNA was mixed with 12.5  $\mu\text{L}$  of TaqMan Gene Expression Master Mix (2X) (Applied Biosystems). For NKp30 isoforms (A, B, and C): 0.75  $\mu\text{L}$  primers (10  $\mu\text{M}$ ) and probe (5  $\mu\text{M}$ ); and for the  $\beta$ -2-microglobulin housekeeping gene ( $\beta$ 2M): 0.5  $\mu\text{L}$  of primers (10  $\mu\text{M}$ ) and probe (5  $\mu\text{M}$ ), were used in a final volume of 25  $\mu\text{L}$ . The PCR conditions were as follows: initial incubation at  $50^{\circ}\text{C}$  for 2 min, denaturation at  $95^{\circ}\text{C}$  for 10 min, followed by 45 cycles at  $95^{\circ}\text{C}$  for 15 sec, and  $60^{\circ}\text{C}$  for 1 min. Costumed PCR primers and TaqMan probes are listed in Suppl. Table 2 (Sigma-Aldrich). For all the other genes, a 1-step RT qPCR was performed (TaqMan<sup>®</sup> RNA-to-Ct<sup>TM</sup> 1-Step Kit, Applied Biosystems) using 1  $\mu\text{g}$  of RNA with 1  $\mu\text{L}$  of Taqman RT-Enzyme Mix 40X (Applied Biosystems), 20  $\mu\text{L}$  of Taqman RT-PCR Mix (2X) (Applied Biosystems) and 2  $\mu\text{L}$  of Taqman Gene Expression Assay (20X) for a final volume of 40  $\mu\text{L}$ . The 1-step RT-qPCR conditions were as follows: initial incubation at  $48^{\circ}\text{C}$  for 15 min, enzyme activation at  $95^{\circ}\text{C}$  for 10 min followed by 45 cycles at  $95^{\circ}\text{C}$  for 15 sec and  $60^{\circ}\text{C}$  for 1min. A StepOnePlus System (Applied Biosystems) was used for temperature cycling and real time

fluorescence measurement. PCR primers were obtained from Applied Biosystems and are listed in Suppl. Table 2. The relative expression of the gene of interest was calculated with the  $2^{-\Delta Ct}$  method<sup>66</sup> normalized to the expression level of  $\beta 2M$ , with the following formula:  $2^{-\Delta Ct} = (2^{-Ct(\text{gene of interest}) - Ct(\text{housekeeping gene})}) \times 10^6$ . The level of expression of the distinct NKp30 isoforms compared with each other (delta,  $\Delta$ ) was determined using the following formula:  $NKp30x - NKp30y = CtNKp30y - CtNKp30x$ , with  $Ct = \text{Cycle threshold}$ . The median of each NKp30 isoform pair delta ( $\Delta$ ) was used for the survival curve analysis.

**Mice experiments.** Female C57Bl/6 mice were obtained from Harlan (France). All animals were maintained in Gustave Roussy Cancer Campus (Villejuif, France) animal facilities according to the Animal Experimental Ethics Committee Guidelines. B16F10 lung metastases. B16F10 tumor cells were obtained from MT Lotze's laboratory. Briefly, 100 $\mu$ L of B16F10 cells were injected intravenously at a concentration of  $2 \times 10^6$  cells/mL in PBS. Treatment of the mice began the next day with intraperitoneal injection of either PBS (100  $\mu$ L) every day, 100  $\mu$ L of mouse recombinant TNF $\alpha$  (Miltenyi Biotec) at 10  $\mu$ g/mL every day or 100  $\mu$ L of Etanercept (Pfizer) at 5mg/mL three times per week. Mice were sacrificed 3 weeks after tumor cells injection and the lungs were sampled. Lungs were dehydrated and fixed by immersing them in paraformaldehyde 4% for 24 h. Lungs were then kept in ethanol 100% until the metastases were counted using a binocular magnifier. RMA/S. Female C57Bl/6 mice obtained from Harlan (France) were injected subcutaneously in the right flank with  $2 \times 10^6$  cells in 100  $\mu$ L of PBS 1X. Three days after injection, mice were treated with intra-peritoneal injections of either PBS every day, 100  $\mu$ L of mouse recombinant TNF $\alpha$  at 10  $\mu$ g/mL every day, 100  $\mu$ L of anti-mouse TNFR2 (Clone TR75-54.7) or isotype control hamster IgG (both from BioXCell) at 5mg/mL for 3 weeks. Seven days after injection, tumor growth was measured every 2 days using calipers.

**Apoptosis assays.** For Annexin V/DAPI staining, cells were incubated for 15 min in dark at room temperature with Annexin V APC (BD Pharmingen), wash with Annexin V buffer and stained with DAPI (BD Pharmingen) 5 min at RT before FACS acquisition.

**Statistical analysis.** Results are expressed as Mean  $\pm$  SEM. Data were analyzed with Prism 5 software (GraphPad, San Diego, CA, USA). The paired t-test, unpaired t-test and the non-parametric Wilcoxon matched pairs test were used for comparison of the different groups as indicated in the Figure Legends. Two-way ANOVA test was used for tumor growth analysis. Spearman test was used for correlations analysis. p-values  $<0.05$  were considered as significant.

## Figure Legends

**Figure 1. Comprehensive transcriptomics analyses revealing TRAF1 and cIAP2/BIRC3 in NK TILs from GIST.** A-B. Heat map representation of microarray analyses of CD3-CD56<sup>bright</sup> NK cells from paired blood and tumors (A) in NKp30 AB versus C profiles (B) on about 20,000 gene products, the most significant hits contrasting the two groups according to the median of the whole cohort being depicted. Of note, for the genes products identified by several distinct probe sets, the most variant was retained in the model. p-values (one-sided differential test) are indicated on the right side for each significant gene product. C-D. RT-PCR evaluation of the transcription of each gene product pre-selected from the microarray analyses, comparing blood versus tumor expression in at least 3 GIST bearing patients (C) or NKp30AB versus NKp30C profiles (D). E. Scatter plot, Pearson correlations coefficient and p-value between TRAF1 and BIRC3 transcript abundancy in tumors. Each dot represents one HV or patient. Wilcoxon matched pairs test: \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

**Figure 2. NK cell stimulation by TNF $\alpha$  or NCR3 triggering leads to markedly increased transcription of Traf1 and Birc3.** A-C. Regulation of expression of TRAF1 and BIRC3 in HV and melanoma patients. RT-PCR of both transcripts in blood-derived-NK cells, performed 12 h post-stimulation with 50 ng/mL of TNF $\alpha$  or after cross-linking of NCR3/NKp30 and CD16 (or IgG2a and IgG, respectively, isotype control Abs). Graphs show the relative expression normalized to  $\beta$ 2 microglobulin expression in HV (A, left panel for TRAF1 and right panel for BIRC3) and melanoma patients (C), with or without blockade of the TNFR2 by specific neutralizing Abs or IgG1 isotype controls (B) in HV (upper panel) and MM (lower panel). D-E. Spearman correlations between TRAF1 and BIRC3 transcript abundancy in blood NK cells post-TNF $\alpha$  stimulation (D) or NKp30 engagement (E). Each dot represents one HV or patient. Student paired t-test for A, Wilcoxon matched pairs test for B-E: \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.



**Figure 3. TNF $\alpha$  markedly and selectively downregulates NCR1 expression.** A-C. Regulation of expression of NCR1 in purified blood NK cells from HV (A) and melanoma patients (B) following 12 h-stimulation with rTNF $\alpha$  at 50 ng/mL or NKp30 engagement or rTGF $\beta$  at 5 ng/mL (C). Each dot represents one HV or patient. D-E. NKp46 protein expression on the cell surface of NK cells as assessed in flow cytometry at 48 h post-stimulation at increasing dosing of rTNF $\alpha$  (5 or 50 ng/mL) or rTGF $\beta$  (5 ng/mL) in concatenated data from at least 6 HV (left panel) and 6 metastatic melanoma (MM, right panel)) (D) and in two representative individuals in overlaid mean fluorescence intensities (E), one treated with rTNF $\alpha$  and TGF $\beta$  (upper panel) and another with different concentration of rTNF $\alpha$  (lower panel). Of note, neutralizing anti-TNFR2 Ab inhibits the down regulation of NKp46 at the surface of MM. MFI were superimposable using an isotype control staining in all conditions of stimulation (not shown). Student paired t-test for A, Wilcoxon matched pairs test B-D: \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

**Figure 4. Anti-correlations between BIRC3 and NCR1 in NKp30C individuals.** A-B. Th1 cytokine release from NK cells stimulated through NKp30 engagement (A) or rTNF $\alpha$  (B) in AB versus C NKp30 profile as determined by ELISA at 12 h (A) and 24 h (B). C. RT-PCR of all three transcripts (TRAF1, BIRC3, NCR1) in blood-derived-NK cells, performed 12 h post-stimulation with 50 ng/mL of TNF $\alpha$  according to the NKp30 isotype profiles. D. Spearman correlations between NCR1 and BIRC3 transcript abundancy in blood NK cells post-TNF $\alpha$  stimulation in all patients, separating NKp30 AB from NKp30C individuals. Wilcoxon matched pairs test A-B, Student paired t-test C: \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

**Figure 5. TNF $\alpha$ -mediated downregulation of NCR1 in intratumor GIST NK cells.** Same experimental settings as in Fig. 4, after sorting of NK cells from fresh GIST tumors. RT-qPCR expression of TRAF1, BIRC3 (A), as well as NCR1 (C) after stimulation with rTNF $\alpha$  (A, C) or NKp30 engagement (B) at 12 h of ex vivo stimulation in 1-3 GIST tumors. D. Membrane expression of NKp46/NCR1 after 48 h incubation of NK TIL with rTGF $\beta$  or TNF $\alpha$  in mean fluorescence intensity. MFI were superimposable using an isotype control staining in all conditions of stimulation (not shown).

**Figure 6. Regulation of metastases dissemination by interfering with the TNF $\alpha$ /TNFR2 interaction.** A. Transcription of Traf1, Birc3 and Ncr1 gene products in mouse splenic NK cells post-stimulation with rTNF $\alpha$  as assessed by RT-PCR at 12 h. Similar experimental settings as with human blood or tumor NK cells. B-C. B16F10 melanoma lung metastases dissemination post i.v. injection at 3 weeks without treatment (PBS injection) or with daily inoculation of 1  $\mu$ g of mouse rTNF $\alpha$  for 3 weeks (C, left) or with an inhibitor of TNF $\alpha$  (Etanercept) twice a week for 3 weeks starting at day 1 post-tumor inoculation (C, right). Representative micrograph pictures of metastatic lungs in each group (B) and concatenated data from 2 experiments yielding similar results (C) at mouse sacrifice. Wilcoxon matched pairs test (A), Mann Whitney test (C): \*p<0.05.

## References

1. Pardoll, D. Cancer and the immune system: basic concepts and targets for intervention. *Semin. Oncol.* 2015, 42 (4), 523–538 DOI: <http://dx.doi.org/10.1053/j.seminoncol.2015.05.003>.
2. Robert, C.; Schachter, J.; Long, G. V; Arance, A.; Grob, J. J.; Mortier, L.; Daud, A.; Carlino, M. S.; McNeil, C.; Lotem, M.; et al. Pembrolizumab versus ipilimumab in advanced melanoma. *N. Engl. J. Med.* 2015, 372 (26), 2521–2532 DOI: [10.1056/NEJMoa1503093](https://doi.org/10.1056/NEJMoa1503093).
3. Robert, C.; Long, G. V; Brady, B.; Dutriaux, C.; Maio, M.; Mortier, L.; Hassel, J. C.; Rutkowski, P.; McNeil, C.; Kalinka-Warzocha, E.; et al. Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N. Engl. J. Med.* 2015, 372 (4), 320–330 DOI: [10.1056/NEJMoa1412082](https://doi.org/10.1056/NEJMoa1412082).
4. Topalian, S. L.; Drake, C. G.; Pardoll, D. M. Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell* 2015, 27 (4), 451–461 DOI: [10.1016/j.ccell.2015.03.001](https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.03.001).
5. Vivier, E.; Tomasello, E.; Baratin, M.; Walzer, T.; Ugolini, S. Functions of natural killer cells. *Nat. Immunol.* 2008, 9 (5), 503–510 DOI: [10.1038/ni1582](https://doi.org/10.1038/ni1582).
6. Raulet, D. H.; Vance, R. E. Self-tolerance of natural killer cells. *Nat Rev Immunol* 2006, 6 (7), 520–531.
7. Guillerrey, C.; Huntington, N. D.; Smyth, M. J. Targeting natural killer cells in cancer immunotherapy. *Nat. Immunol.* 2016, 17 (9), 1025–1036 DOI: [10.1038/ni.3518](https://doi.org/10.1038/ni.3518).
8. Stojanovic, A.; Fiegler, N.; Brunner-Weinzierl, M.; Cerwenka, A. CTLA-4 is expressed by activated mouse NK cells and inhibits NK cell IFN- $\gamma$  production in response to mature dendritic cells. *J. Immunol.* 2014, 192 (9), 4184–4191 DOI: [10.4049/jimmunol.1302091](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302091).

9. Huang, B. Y.; Zhan, Y. P.; Zong, W. J.; Yu, C. J.; Li, J. F.; Qu, Y. M.; Han, S. The PD-1/B7-H1 pathway modulates the natural killer cells versus mouse glioma stem cells. *PLoS One* 2015, 10 (8), 1–14 DOI: 10.1371/journal.pone.0134715.
10. Westin, J. R.; Chu, F.; Zhang, M.; Fayad, L. E.; Kwak, L. W.; Fowler, N.; Romaguera, J.; Hagemester, F.; Fanale, M.; Samaniego, F.; et al. Safety and activity of PD1 blockade by pidilizumab in combination with rituximab in patients with relapsed follicular lymphoma: a single group, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2014, 15 (1), 69–77 DOI: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70551-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70551-5).
11. Pires da Silva, I.; Gallois, A.; Jimenez Baranda, S.; Khan, S.; Anderson, A. C.; Kuchroo, V. K.; Osman, I.; Bhardwaj, N. Reversal of NK cell exhaustion in advanced melanoma by Tim-3 blockade. *Cancer Immunol. Res.* 2014.
12. Romagné, F.; André, P.; Spee, P.; Zahn, S.; Anfossi, N.; Gauthier, L.; Capanni, M.; Ruggeri, L.; Benson, D. M.; Blaser, B. W.; et al. Preclinical characterization of 1-7F9, a novel human anti-KIR receptor therapeutic antibody that augments natural killer-mediated killing of tumor cells. *Blood* 2009, 114 (13), 2667 LP-2677.
13. Benson, D. M.; Hofmeister, C. C.; Padmanabhan, S.; Suvannasankha, A.; Jagannath, S.; Abonour, R.; Bakan, C.; Andre, P.; Efebera, Y.; Tiollier, J.; et al. A phase 1 trial of the anti-KIR antibody IPH2101 in patients with relapsed/refractory multiple myeloma. *Blood* 2012, 120 (22), 4324 LP-4333.
14. Vey, N.; Bourhis, J.-H.; Boissel, N.; Bordessoule, D.; Prebet, T.; Charbonnier, A.; Etienne, A.; Andre, P.; Romagne, F.; Benson, D.; et al. A phase 1 trial of the anti-inhibitory KIR mAb IPH2101 for AML in complete remission. *Blood* 2012, 120 (22), 4317 LP-4323.
15. Blake, S. J.; Stannard, K.; Liu, J.; Allen, S.; Yong, M. C. R.; Mittal, D.; Aguilera, A. R.; Miles, J. J.; Lutzky, V. P.; de Andrade, L. F.; et al. Suppression of metastases using a new lymphocyte checkpoint target for cancer immunotherapy. *Cancer Discov.* 2016, 6 (4), 446 LP-459.
16. Stanietsky, N.; Simic, H.; Arapovic, J.; Toporik, A.; Levy, O.; Novik, A.; Levine, Z.;

- Beiman, M.; Dassa, L.; Achdout, H.; et al. The interaction of TIGIT with PVR and PVRL2 inhibits human NK cell cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2009, 106 (42), 17858–17863 DOI: 10.1073/pnas.0903474106.
17. Paolino, M.; Choidas, A.; Wallner, S.; Pranjic, B.; Uribesalgo, I.; Loeser, S.; Jamieson, A. M.; Langdon, W. Y.; Ikeda, F.; Fededa, J. P.; et al. The E3 ligase Cbl-b and TAM receptors regulate cancer metastasis via natural killer cells. *Nature* 2014, 507 (7493), 508–512.
  18. Putz, E. M.; Gotthardt, D.; Hoermann, G.; Csiszar, A.; Wirth, S.; Berger, A.; Straka, E.; Rigler, D.; Wallner, B.; Jamieson, A. M.; et al. CDK8-mediated STAT1-S727 phosphorylation restrains NK cell cytotoxicity and tumor surveillance. *Cell Rep.* 2013, 4 (3), 437–444 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.07.012>.
  19. Parameswaran, R.; Ramakrishnan, P.; Moreton, S. A.; Xia, Z.; Hou, Y.; Lee, D. A.; Gupta, K.; DeLima, M.; Beck, R. C.; Wald, D. N. Repression of GSK3 restores NK cell cytotoxicity in AML patients. *Nat. Commun.* 2016, 7, 11154 DOI: 10.1038/ncomms11154.
  20. Delconte, R. B.; Kolesnik, T. B.; Dagley, L. F.; Rautela, J.; Shi, W.; Putz, E. M.; Stannard, K.; Zhang, J.-G.; Teh, C.; Firth, M.; et al. CIS is a potent checkpoint in NK cell-mediated tumor immunity. *Nat Immunol* 2016, 17 (7), 816–824.
  21. Putz, E. M.; Guillerey, C.; Kos, K.; Stannard, K.; Miles, K.; Delconte, R. B.; Takeda, K.; Nicholson, S. E.; Huntington, N. D.; Smyth, M. J. Targeting cytokine signaling checkpoint CIS activates NK cells to protect from tumor initiation and metastasis. *Oncoimmunology* 2017, 6 (2), e1267892 DOI: 10.1080/2162402X.2016.1267892.
  22. Gillard-Bocquet, M.; Caer, C.; Cagnard, N.; Crozet, L.; Perez, M.; Fridman, W. H.; Sautes-fridman, C.; Cremer, I. Lung tumor microenvironment induces specific gene expression signature in intratumoral NK cells. *Front. Immunol.* 2013, 4, 19 DOI: 10.3389/fimmu.2013.00019.
  23. Platonova, S.; Cherfils-Vicini, J.; Damotte, D.; Crozet, L.; Vieillard, V.; Validire, P.; André, P.; Dieu-Nosjean, M.-C.; Alifano, M.; Régnard, J.-F.; et al. Profound coordinated

- alterations of intratumoral NK cell phenotype and function in lung carcinoma. *Cancer Res.* 2011, 71 (16), 5412 LP-5422.
24. Semeraro, M.; Rusakiewicz, S.; Minard-Colin, V.; Delahaye, N. F.; Enot, D.; Vély, F.; Marabelle, A.; Papoular, B.; Piperoglou, C.; Ponzoni, M.; et al. Clinical impact of the NKp30/B7-H6 axis in high-risk neuroblastoma patients. *Sci. Transl. Med.* 2015, 7 (283), 283ra55 DOI: 10.1126/scitranslmed.aaa2327.
25. Rusakiewicz, S.; Semeraro, M.; Sarabi, M.; Desbois, M.; Locher, C.; Mendez, R.; Vimond, N.; Concha, A.; Garrido, F.; Isambert, N.; et al. Immune infiltrates are prognostic factors in localized gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res.* 2013, 73 (12), 3499–3510 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-0371.
26. Rusakiewicz, S.; Perier, A.; Semeraro, M.; Pitt, J. M.; Pogge von Strandmann, E.; Reiners, K. S.; Aspeslagh, S.; Pipérogrou, C.; Vély, F.; Ivagnes, A.; et al. NKp30 isoforms and NKp30 ligands are predictive biomarkers of response to imatinib mesylate in metastatic GIST patients. *Oncoimmunology* 2017, 6 (1), e1137418 DOI: 10.1080/2162402X.2015.1137418.
27. Delahaye, N. F.; Rusakiewicz, S.; Martins, I.; Menard, C.; Roux, S.; Lyonnet, L.; Paul, P.; Sarabi, M.; Chaput, N.; Semeraro, M.; et al. Alternatively spliced NKp30 isoforms affect the prognosis of gastrointestinal stromal tumors. *Nat Med* 2011, 17 (6), 700–707 DOI: 10.1038/nm.2366.
28. Zitvogel, L.; Rusakiewicz, S.; Routy, B.; Ayyoub, M.; Kroemer, G. Immunological off-target effects of imatinib. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2016 DOI: 10.1038/nrclinonc.2016.41.
29. Messaoudene, M.; Fregni, G.; Fourmentraux-Neves, E.; Chanal, J.; Maubec, E.; Mazouz-Dorval, S.; Couturaud, B.; Girod, A.; Sastre-Garau, X.; Albert, S.; et al. Mature cytotoxic CD56<sup>bright</sup>/CD16<sup>+</sup> natural killer cells can infiltrate lymph nodes adjacent to metastatic melanoma. *Cancer Res.* 2014, 74 (1), 81 LP-92.
30. Semeraro, M.; Adam, J.; Stoll, G.; Louvet, E.; Chaba, K.; Poirier-Colame, V.; Sauvat, A.; Senovilla, L.; Vacchelli, E.; Bloy, N.; et al. The ratio of CD8<sup>+</sup>/FOXP3 T lymphocytes

- infiltrating breast tissues predicts the relapse of ductal carcinoma in situ. *Oncoimmunology* 2016, 5 (10), e1218106 DOI: 10.1080/2162402X.2016.1218106.
31. Fend, L.; Rusakiewicz, S.; Adam, J.; Bastien, B.; Caignard, A.; Messaoudene, M.; Iribarren, C.; Cremer, I.; Marabelle, A.; Borg, C.; et al. Prognostic impact of the expression of NCR1 and NCR3 NK cell receptors and PD-L1 on advanced non-small cell lung cancer. *Oncoimmunology* 2017, 6 (1), e1163456 DOI: 10.1080/2162402X.2016.1163456.
  32. Mahoney, D. J.; Cheung, H. H.; Mrad, R. L.; Plenchette, S.; Simard, C.; Enwere, E.; Arora, V.; Mak, T. W.; Lacasse, E. C.; Waring, J.; et al. Both cIAP1 and cIAP2 regulate TNF $\alpha$ -mediated NF- $\kappa$ B activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008, 105 (33), 11778–11783 DOI: 10.1073/pnas.0711122105.
  33. Vince, J. E.; Pantaki, D.; Feltham, R.; Mace, P. D.; Cordier, S. M.; Schmukle, A. C.; Davidson, A. J.; Callus, B. A.; Wong, W. W. L.; Gentle, I. E.; et al. TRAF2 must bind to cellular inhibitors of apoptosis for tumor necrosis factor (TNF) to efficiently activate NF- $\kappa$ B and to prevent TNF-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 2009, 284 (51), 35906–35915 DOI: 10.1074/jbc.M109.072256.
  34. Taïeb, J.; Maruyama, K.; Borg, C.; Terme, M.; Zitvogel, L. Imatinib mesylate impairs Flt3L-mediated dendritic cell expansion and antitumor effects in vivo. *Blood* 2004, 103 (5), 1966 LP-1967.
  35. Glasner, A.; Ghadially, H.; Gur, C.; Stanietsky, N.; Tsukerman, P.; Enk, J.; Mandelboim, O. Recognition and prevention of tumor metastasis by the NK receptor NKp46/NCR1. *J. Immunol.* 2012, 188 (6), 2509–2515 DOI: 10.4049/jimmunol.1102461.
  36. Rothe, M.; Wong, S. C.; Henzel, W. J.; Goeddel, D. V. A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 1994, 78 (4), 681–692 DOI: 10.1016/0092-8674(94)90532-0.
  37. Zapata, J. M.; Reed, J. C. TRAF1: lord without a RING. *Sci. Signal.* 2002, 2002 (133), pe27-pe27 DOI: 10.1126/stke.2002.133.pe27.

38. Leo, E.; Deveraux, Q. L.; Buchholtz, C.; Welsh, K.; Matsuzawa, S. I.; Stennicke, H. R.; Salvesen, G. S.; Reed, J. C. TRAF1 Is a substrate of caspases activated during tumor necrosis factor receptor- $\alpha$ -induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 2001, 276 (11), 8087–8093 DOI: 10.1074/jbc.M009450200.
39. Jang, H. D.; Chung, Y. M.; Baik, J. H.; Choi, Y. G.; Park, I.-S.; Jung, Y. K.; Lee, S. Y. Caspase-cleaved TRAF1 negatively regulates the antiapoptotic signals of TRAF2 during TNF-induced cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001, 281 (2), 499–505 DOI: 10.1006/bbrc.2001.4369.
40. Speiser, D. E.; Lee, S. Y.; Wong, B.; Arron, J.; Santana, A.; Kong, Y.-Y.; Ohashi, P. S.; Choi, Y. A regulatory role for TRAF1 in Antigen-induced apoptosis of T cells. *J. Exp. Med.* 1997, 185 (10), 1777 LP-1783.
41. Duckett, C. S.; Gedrich, R. W.; Gilfillan, M. C.; Thompson, C. B.; Duckett, C. S.; Gedrich, R. W.; Gilfillan, M. C. Induction of nuclear factor kappaB by the CD30 receptor is mediated by TRAF1 and TRAF2. *Mol Cell Biol* 1997, 17 (3), 1535–1542.
42. Tsitsikov, E. N.; Laouini, D.; Dunn, I. F.; Sannikova, T. Y.; Davidson, L.; Alt, F. W.; Geha, R. S. TRAF1 is a negative regulator of TNF signaling: enhanced TNF signaling in TRAF1-deficient mice. *Immunity* 2001, 15 (4), 647–657 DOI: 10.1016/S1074-7613(01)00207-2.
43. Carpentier, I.; Beyaert, R. TRAF1 is a TNF inducible regulator of NF- $\kappa$ B activation. *FEBS Lett.* 1999, 460 (2), 246–250 DOI: 10.1016/S0014-5793(99)01356-3.
44. Pandey, R.; DeStephan, C. M.; Madge, L. A.; May, M. J.; Orange, J. S. NKp30 ligation induces rapid activation of the canonical NF- $\kappa$ B pathway in NK cells. *J. Immunol.* 2007, 179 (11), 7385–7396 DOI: 10.4049/jimmunol.179.11.7385.
45. Hu, W.-T.; Huang, L.-L.; Li, M.-Q.; Jin, L.-P.; Li, D.-J.; Zhu, X.-Y. Decidual stromal cell-derived IL-33 contributes to Th2 bias and inhibits decidual NK cell cytotoxicity through NF- $\kappa$ B signaling in human early pregnancy. *J. Reprod. Immunol.* 2015, 109, 52–65 DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jri.2015.01.004>.



46. Almishri, W.; Santodomingo-Garzon, T.; Le, T.; Stack, D.; Mody, C. H.; Swain, M. G. TNF $\alpha$  augments cytokine-induced NK Cell IFN $\gamma$  production through TNFR2. *J. Innate Immun.* 2016, 8 (6), 617–629.
47. Nocturne, G.; Boudaoud, S.; Ly, B.; Pascaud, J.; Paoletti, A.; Mariette, X. Impact of anti-TNF therapy on NK cells function and on immunosurveillance against B-cell lymphomas. *J. Autoimmun.* 2017, 80, 56–64 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2017.02.001>.
48. Ross, M. E.; Caligiuri, M. A. Cytokine-induced apoptosis of human natural killer cells identifies a novel mechanism to regulate the innate immune response. *Blood* 1997, 89 (3), 910 LP-918.
49. Takayama, T.; Kamada, N.; Chinen, H.; Okamoto, S.; Kitazume, M. T.; Chang, J.; Matuzaki, Y.; Suzuki, S.; Sugita, A.; Koganei, K.; et al. Imbalance of NKp44+ NKp46– and NKp44– NKp46+ natural killer cells in the intestinal mucosa of patients with crohn’s disease. *Gastroenterology* 2010, 139 (3), 882–892.e3 DOI: <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2010.05.040>.
50. Nel, I.; Lucar, O.; Petitdemange, C.; Béziat, V.; Lapalus, M.; Bédossa, P.; Debré, P.; Asselah, T.; Marcellin, P.; Vieillard, V. Accumulation of intrahepatic TNF- $\alpha$ -producing NKp44+ NK cells correlates with liver fibrosis and viral load in chronic HCV infection. *Medicine (Baltimore)*. 2016, 95 (19), e3678 DOI: 10.1097/MD.0000000000003678.
51. Pembroke, T.; Christian, A.; Jones, E.; Hills, R. K.; Wang, E. C. Y.; Gallimore, A. M.; Godkin, A. The paradox of NKp46+ natural killer cells: drivers of severe hepatitis C virus-induced pathology but in-vivo resistance to interferon  $\alpha$  treatment. *Gut* 2014, 63 (3), 515–524 DOI: 10.1136/gutjnl-2013-304472.
52. Radaeva, S.; Sun, R.; Jaruga, B.; Nguyen, V. T.; Tian, Z.; Gao, B. Natural killer cells ameliorate liver fibrosis by killing activated stellate cells in NKG2D-dependent and tumor necrosis factor–related apoptosis-inducing ligand–dependent manners. *Gastroenterology* 2006, 130 (2), 435–452 DOI: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.10.055>.
53. De Maria, A.; Fogli, M.; Costa, P.; Murdaca, G.; Puppo, F.; Mavilio, D.; Moretta, A.;

- Moretta, L. The impaired NK cell cytolytic function in viremic HIV-1 infection is associated with a reduced surface expression of natural cytotoxicity receptors (NKp46, NKp30 and NKp44). *Eur. J. Immunol.* 2003, 33 (9), 2410–2418 DOI: 10.1002/eji.200324141.
54. Gazit, R.; Gruda, R.; Elboim, M.; Arnon, T. I.; Katz, G.; Achdout, H.; Hanna, J.; Qimron, U.; Landau, G.; Greenbaum, E.; et al. Lethal influenza infection in the absence of the natural killer cell receptor gene *Ncr1*. *Nat. Immunol.* 2006, 7 (5), 517–523 DOI: 10.1038/ni1322.
55. Alvarez-Breckenridge, C. A.; Yu, J.; Price, R.; Wojton, J.; Pradarelli, J.; Mao, H.; Wei, M.; Wang, Y.; He, S.; Hardcastle, J.; et al. NK cells impede glioblastoma virotherapy through NKp30 and NKp46 natural cytotoxicity receptors. *Nat Med* 2012, 18 (12), 1827–1834.
56. Parsons, M. S.; Tang, C.-C.; Jegaskanda, S.; Center, R. J.; Brooks, A. G.; Stratov, I.; Kent, S. J. Anti-HIV antibody–dependent activation of NK cells impairs NKp46 expression. *J. Immunol.* 2013, 192 (1), 308 LP-315.
57. Mercer, L. K.; Askling, J.; Raaschou, P.; Dixon, W. G.; Dreyer, L.; Hetland, M. L.; Strangfeld, A.; Zink, A.; Mariette, X.; Finckh, A.; et al. Risk of invasive melanoma in patients with rheumatoid arthritis treated with biologics: results from a collaborative project of 11 European biologic registers. *Ann. Rheum. Dis.* 2017, 76 (2), 386 LP-391.
58. O’Rielly, D. D.; Roslin, N. M.; Beyene, J.; Pope, A.; Rahman, P.  $\text{TNF-}\alpha$  -308 G/A polymorphism and responsiveness to  $\text{TNF-}\alpha$  blockade therapy in moderate to severe rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. *Pharmacogenomics J* 2009, 9 (3), 161–167.
59. Zhu, J.; Zhang, D.; Wu, F.; He, F.; Liu, X.; Wu, L.; Zhou, B.; Liu, J.; Lu, F.; Liu, J.; et al. Single nucleotide polymorphisms at the TRAF1/C5 locus are associated with rheumatoid arthritis in a Han Chinese population. *BMC Med. Genet.* 2011, 12 (1), 53 DOI: 10.1186/1471-2350-12-53.

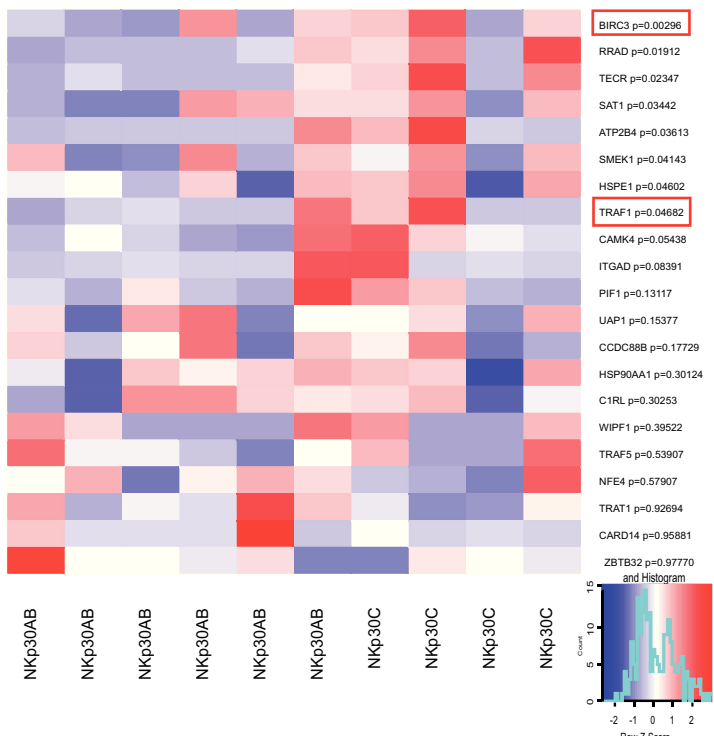
60. Han, T. U.; Bang, S. Y.; Kang, C.; Bae, S. C. Traf1 polymorphisms associated with rheumatoid arthritis susceptibility in asians and in caucasians. *Arthritis Rheum* 2009, 60 DOI: 10.1002/art.24759.
61. Cerhan, J. R.; Ansell, S. M.; Fredericksen, Z. S.; Kay, N. E.; Liebow, M.; Call, T. G.; Dogan, A.; Cunningham, J. M.; Wang, A. H.; Liu-Mares, W.; et al. Genetic variation in 1253 immune and inflammation genes and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 2007, 110 (13), 4455 LP-4463.
62. Abdul-Sater, A. A.; Edilova, M. I.; Clouthier, D. L.; Mbanwi, A.; Kremmer, E.; Watts, T. H. The signaling adaptor TRAF1 negatively regulates Toll-like receptor signaling and this underlies its role in rheumatic disease. *Nat Immunol* 2017, 18 (1), 26–35.
63. Nishimoto, T.; Seta, N.; Anan, R.; Yamamoto, T.; Kaneko, Y.; Takeuchi, T.; Kuwana, M. A single nucleotide polymorphism of TRAF1 predicts the clinical response to anti-TNF treatment in Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 2013, 32 (2), 211–217.
64. Kruit, W. H. J.; van Ojik, H. H.; Brichard, V. G.; Escudier, B.; Dorval, T.; Dréno, B.; Patel, P.; van Baren, N.; Avril, M.-F.; Piperno, S.; et al. Phase 1/2 study of subcutaneous and intradermal immunization with a recombinant MAGE-3 protein in patients with detectable metastatic melanoma. *Int. J. Cancer* 2005, 117 (4), 596–604 DOI: 10.1002/ijc.21264.
65. Ritchie, M. E.; Phipson, B.; Wu, D.; Hu, Y.; Law, C. W.; Shi, W.; Smyth, G. K. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* 2015, 43 (7), e47 DOI: 10.1093/nar/gkv007.
66. Livak, K. J.; Schmittgen, T. D. analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods* 2001, 25 (4), 402–408 DOI: <http://dx.doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.

Figure 1

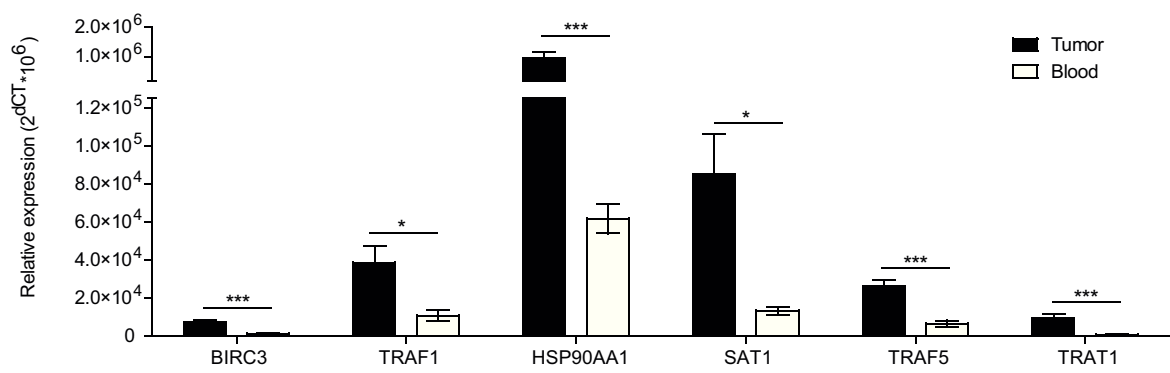
A.



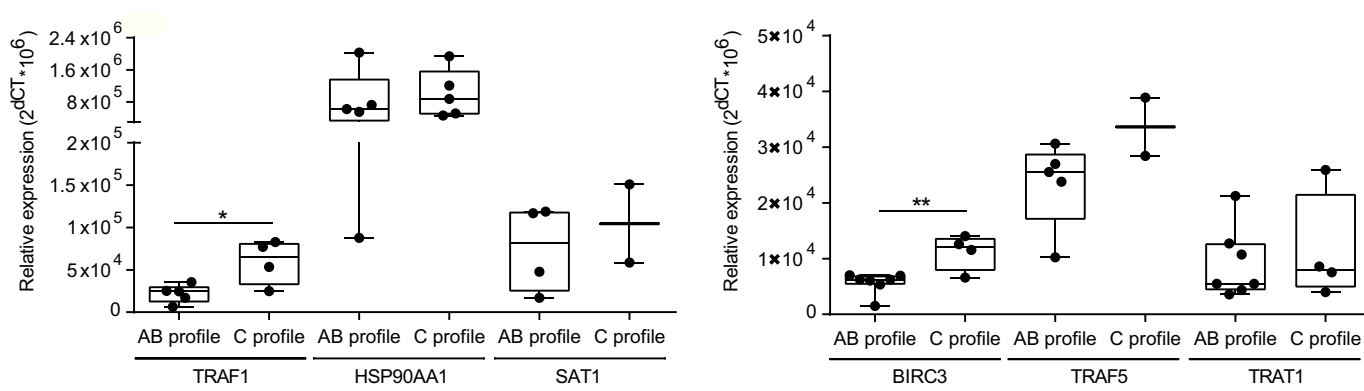
B.



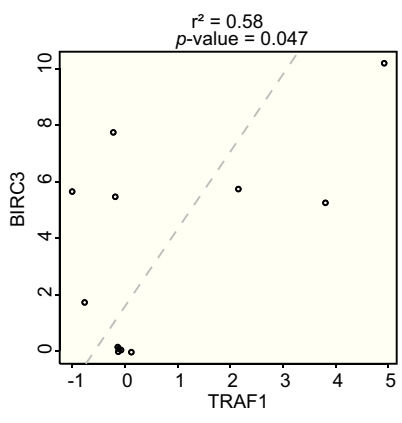
C.



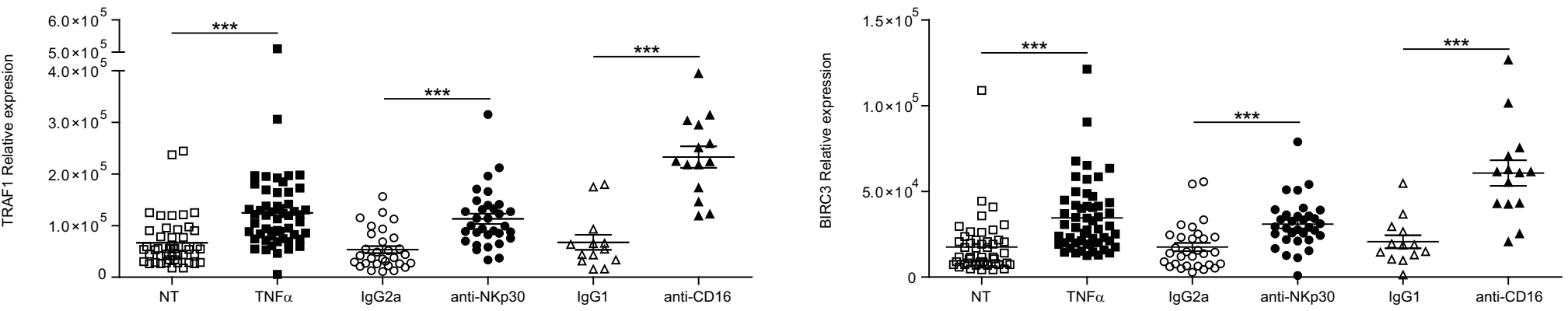
D.



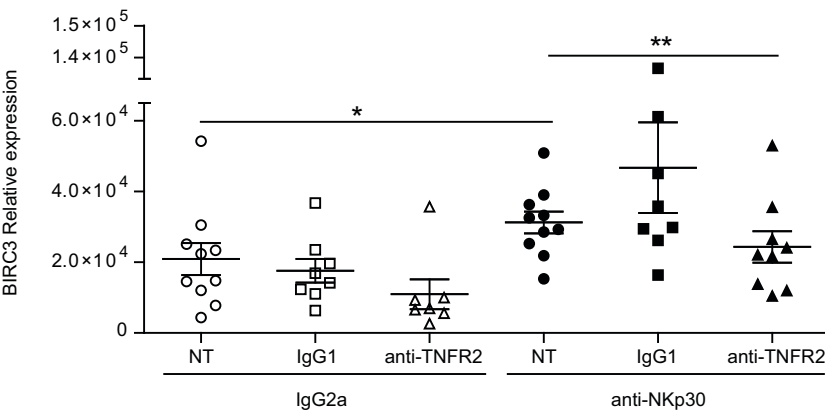
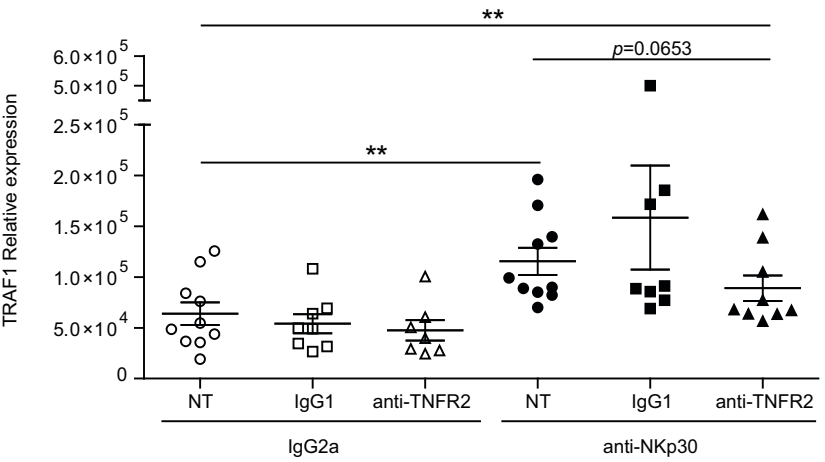
E.



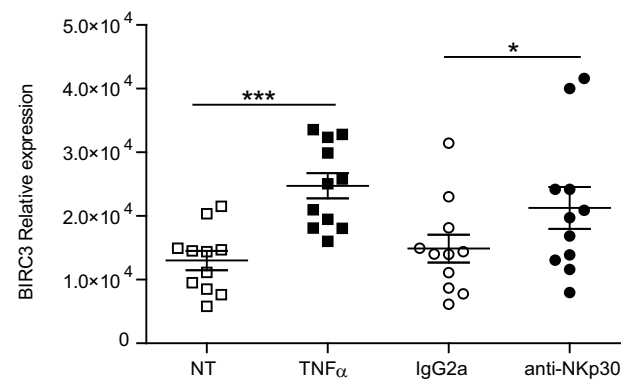
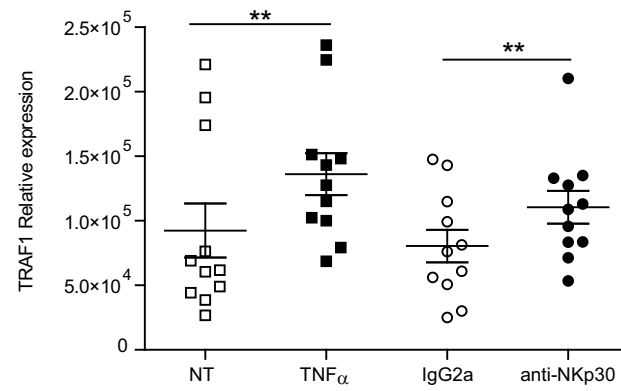
A. HV



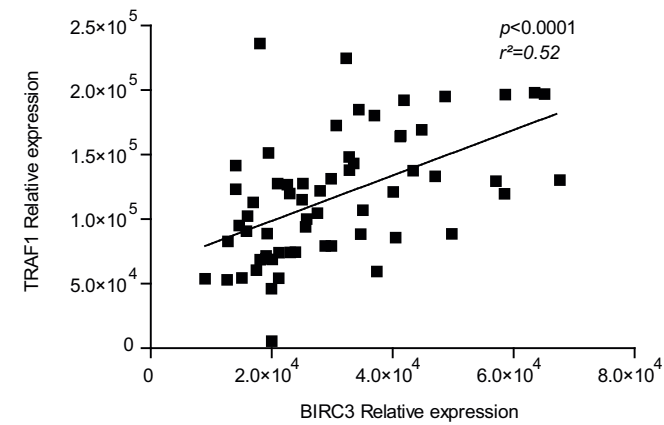
B. HV



C. MM



D. HV+ MM



E. HV+ MM

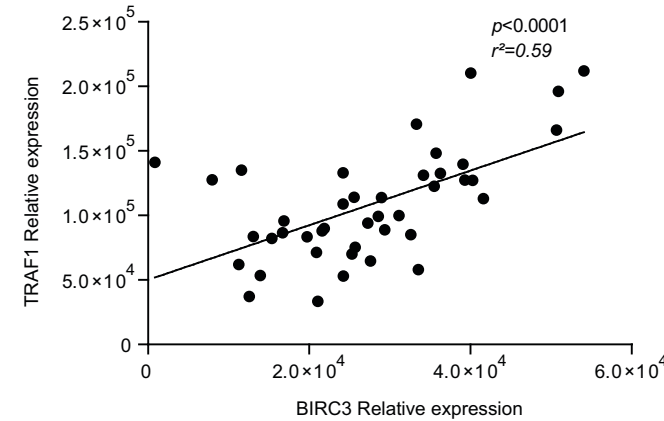
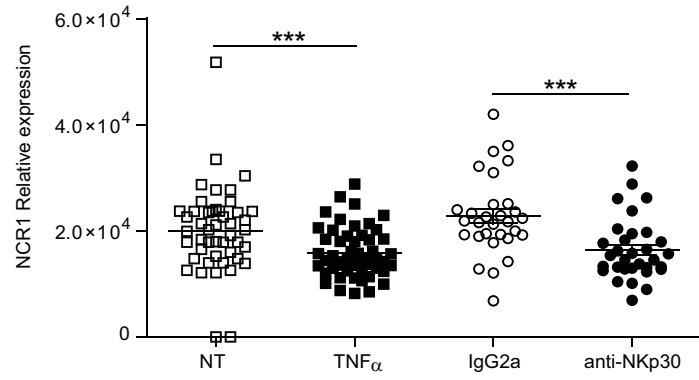
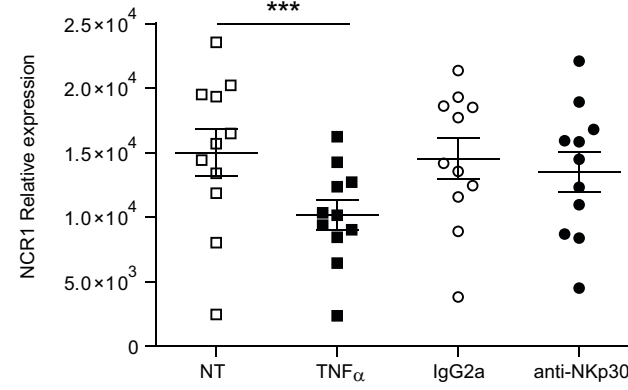


Figure 3

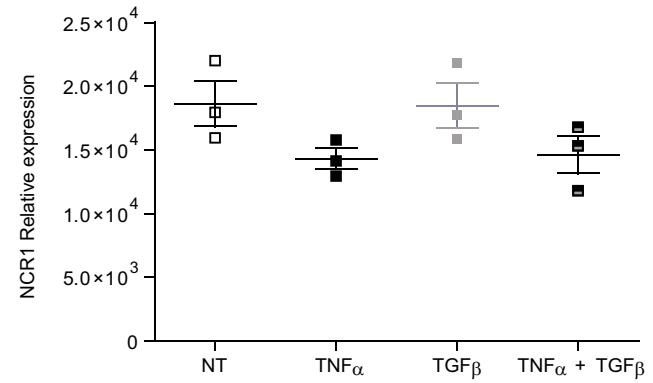
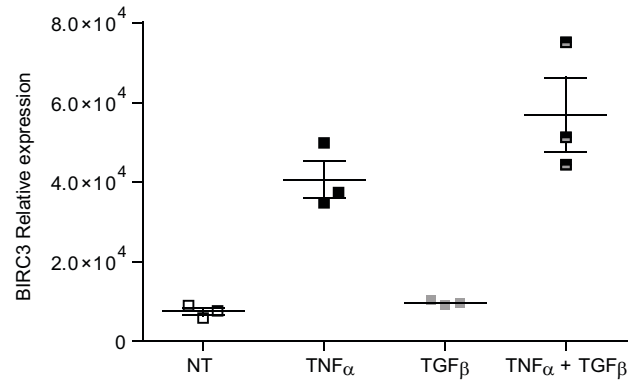
A. HV



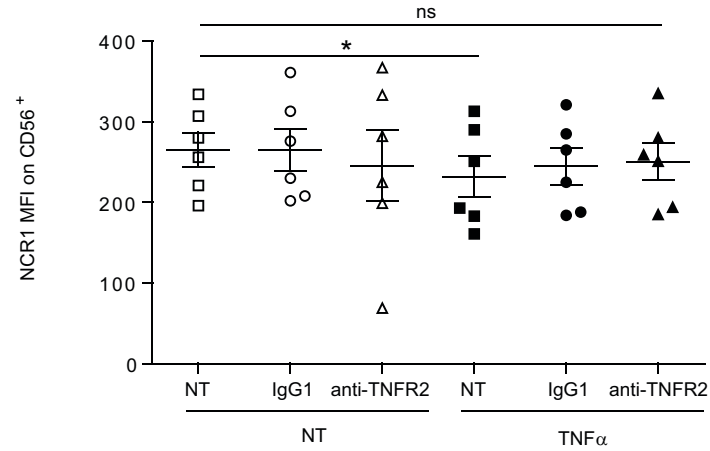
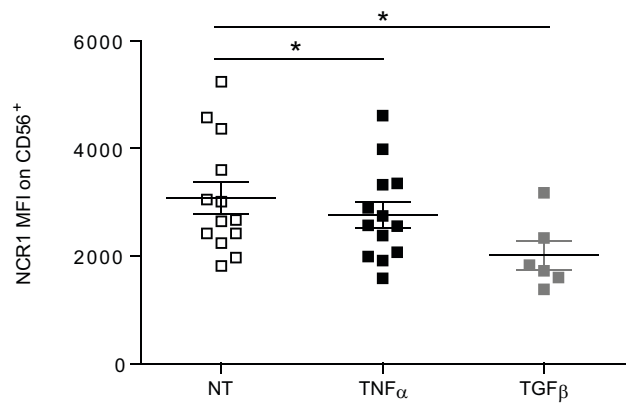
B. MM.



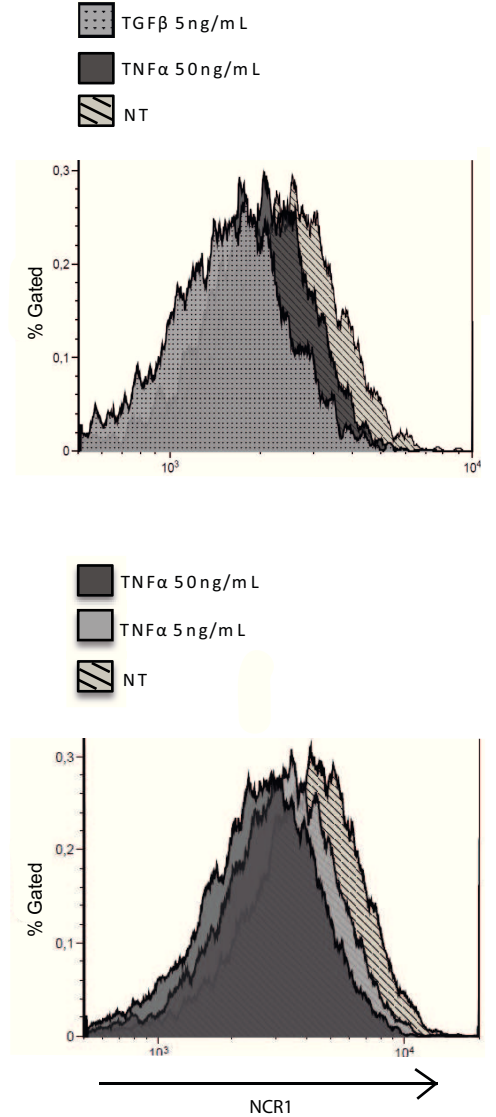
C. HV



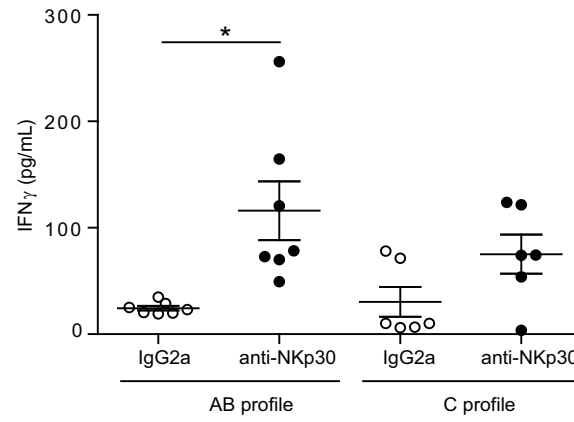
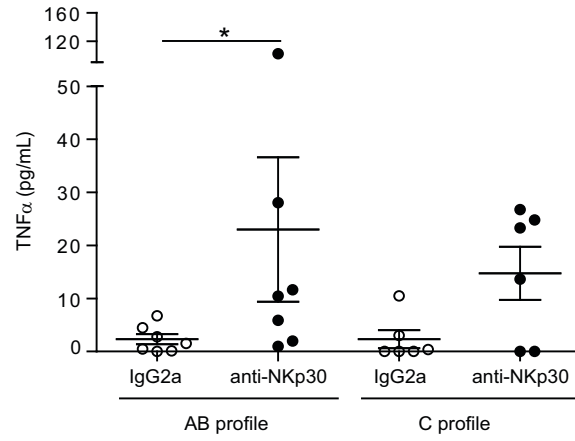
D.



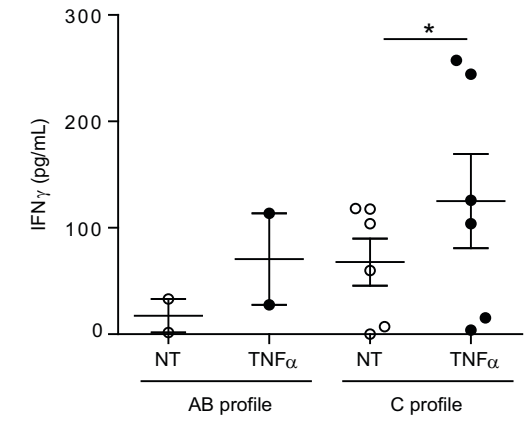
E.



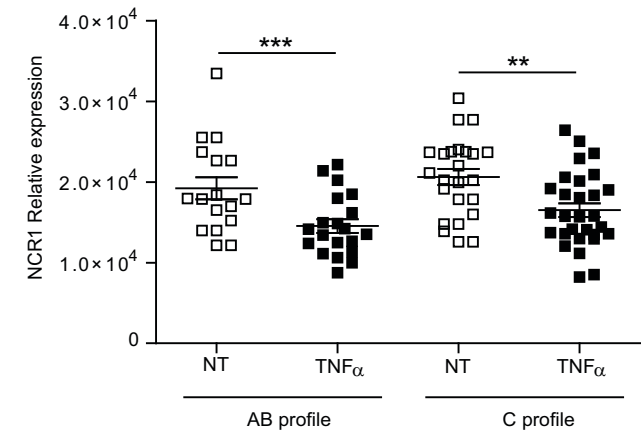
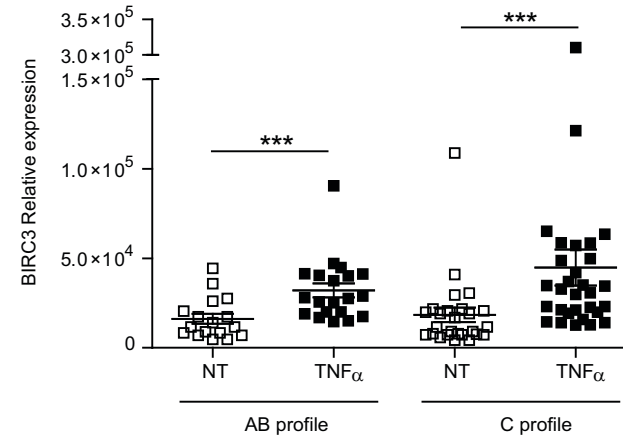
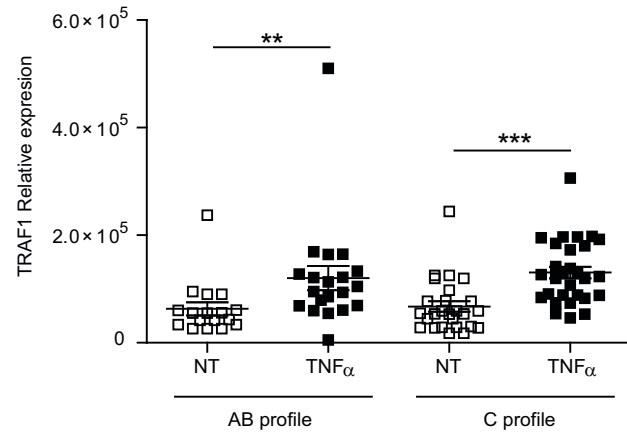
A.



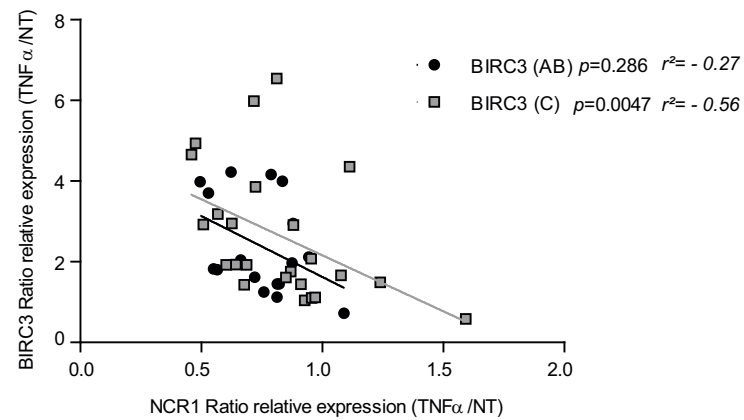
B.



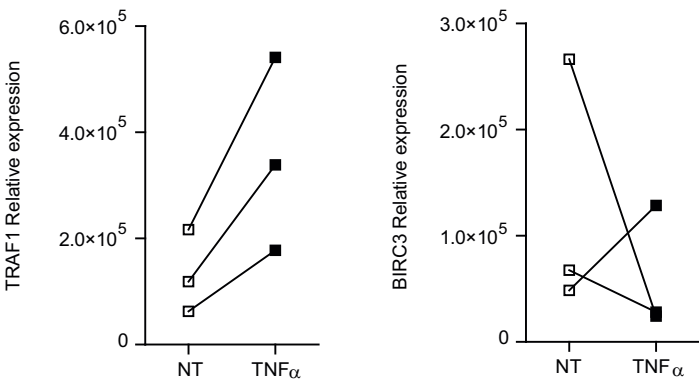
C.



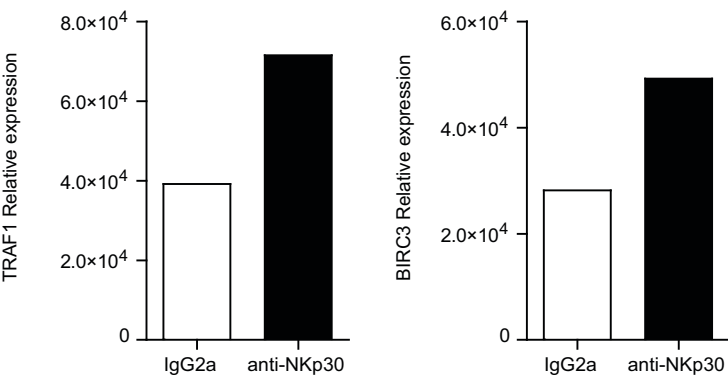
D.



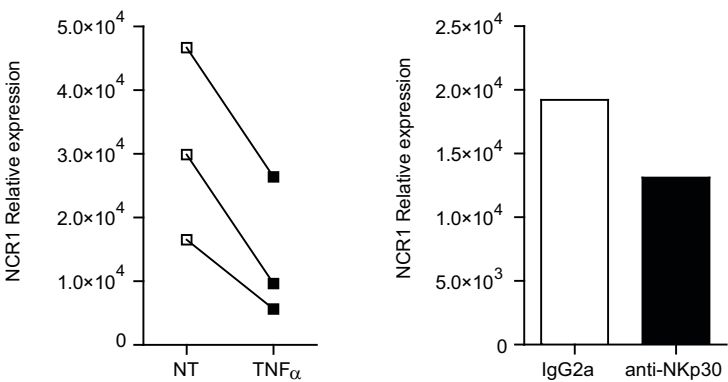
A.



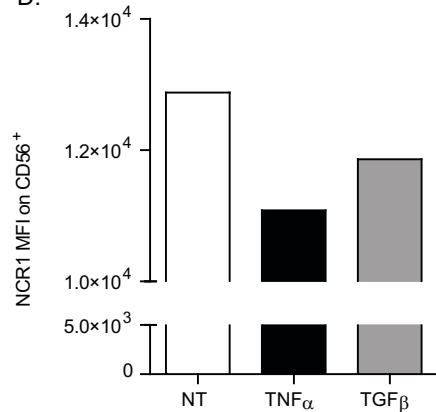
B.



C.

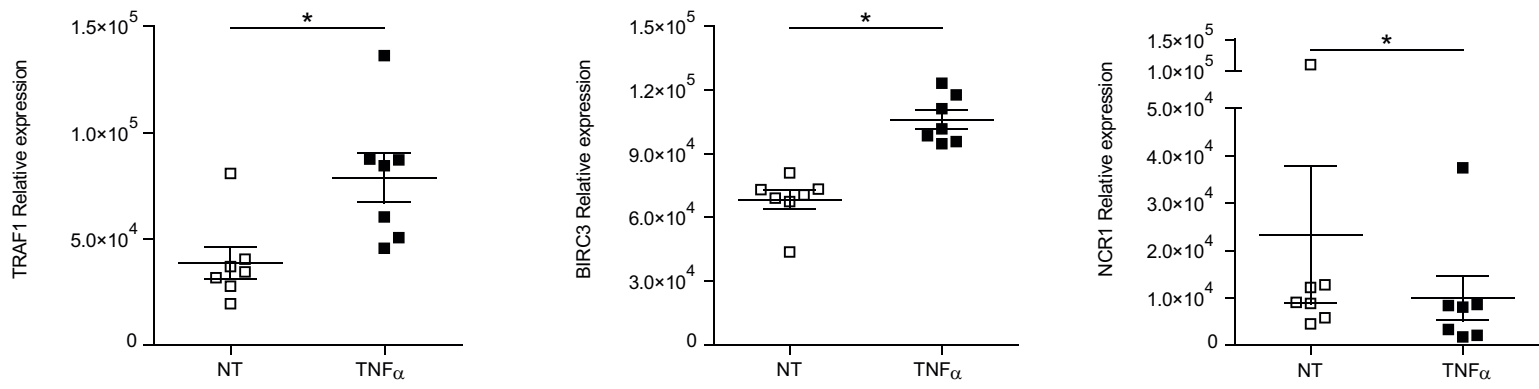


D.

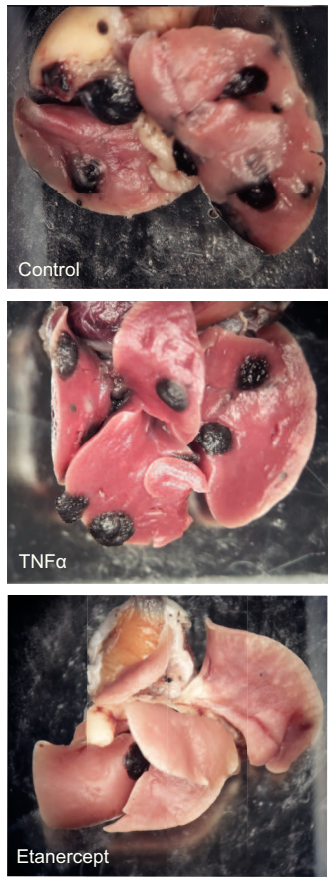




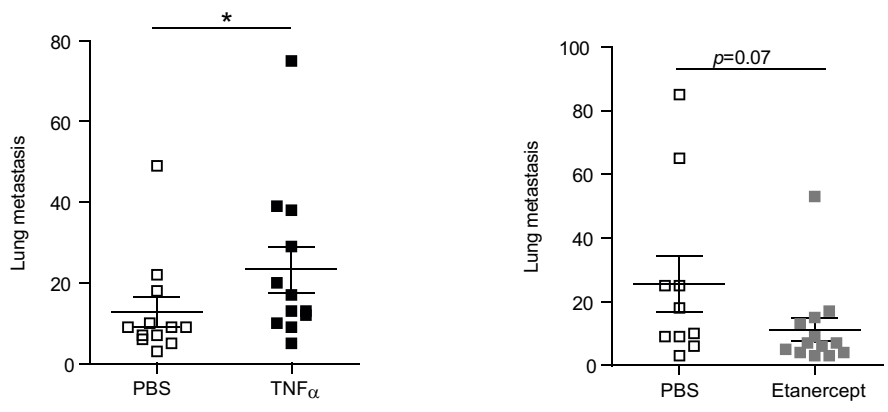
A.



B.



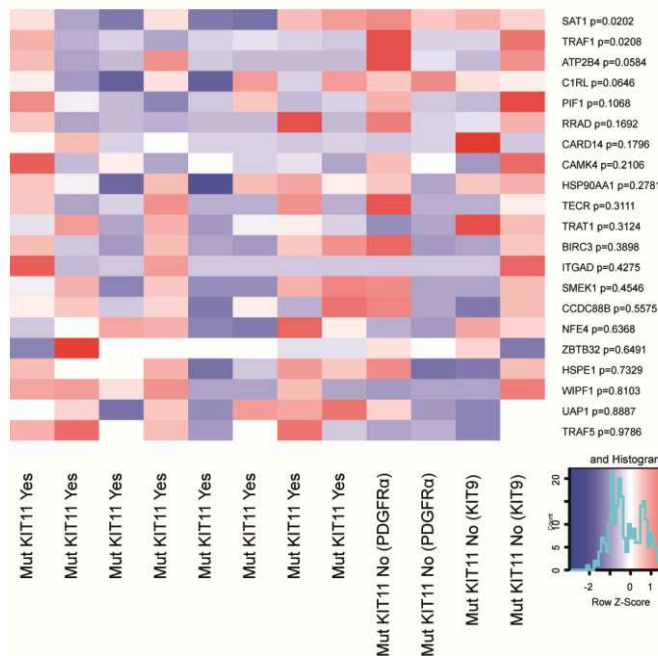
C.



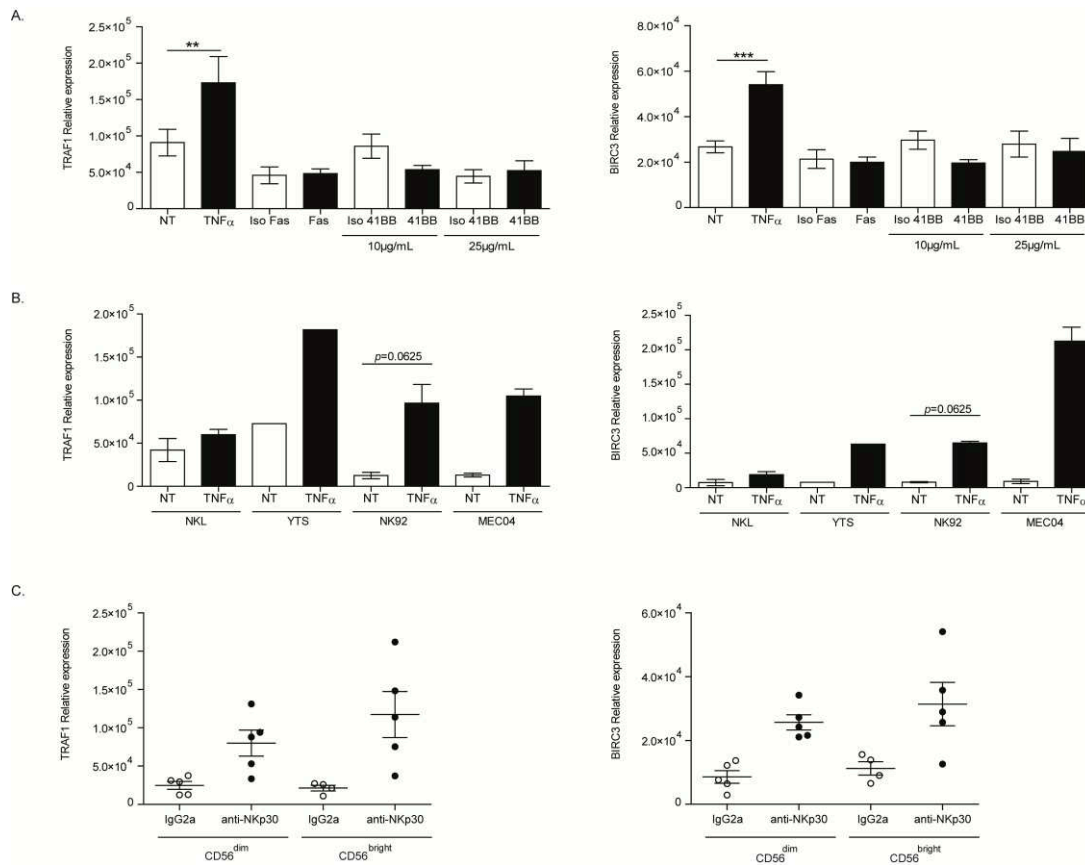
**Suppl. Table 1.** Patient characteristics

		<b>n= 17</b>
<b>Age-yr</b>	Median	70
	Range	43-92
<b>Sex - no.(%)</b>	Male	11 (65)
	Female	6 (35)
<b>Site of tumor at diagnosis - no.(%)</b>	Stomach	11 (65)
	Duodenum	1 (6)
	Small intestine	5 (29)
<b>Metastatic disease - no.(%)</b>		3 (18)
<b>Modified NIH consensus criteria- no.(%)</b>	1	2 (12)
	2	2 (12)
	3	6 (35)
	4	7 (41)
<b>Mutation location - no.(%)</b>	KIT exon 9	2 (12)
	KIT exon 11	11 (65)
	PDGFRA exon 12 or 18	2 (12)
	None, wild-type KIT and PDGFRA	1 (6)
	Not available	1 (6)
<b>Medical Treatment - no.(%)</b>	Neoadjuvant tyrosine kinase inhibitor	0
		13 (76)
	Adjuvant tyrosine kinase inhibitor	3 (18)
	None	1 (6)
	Not available	
<b>Clinical outcome - no.(%)</b>	No evolutive disease	14 (82)
	Alive with disease	3 (18)

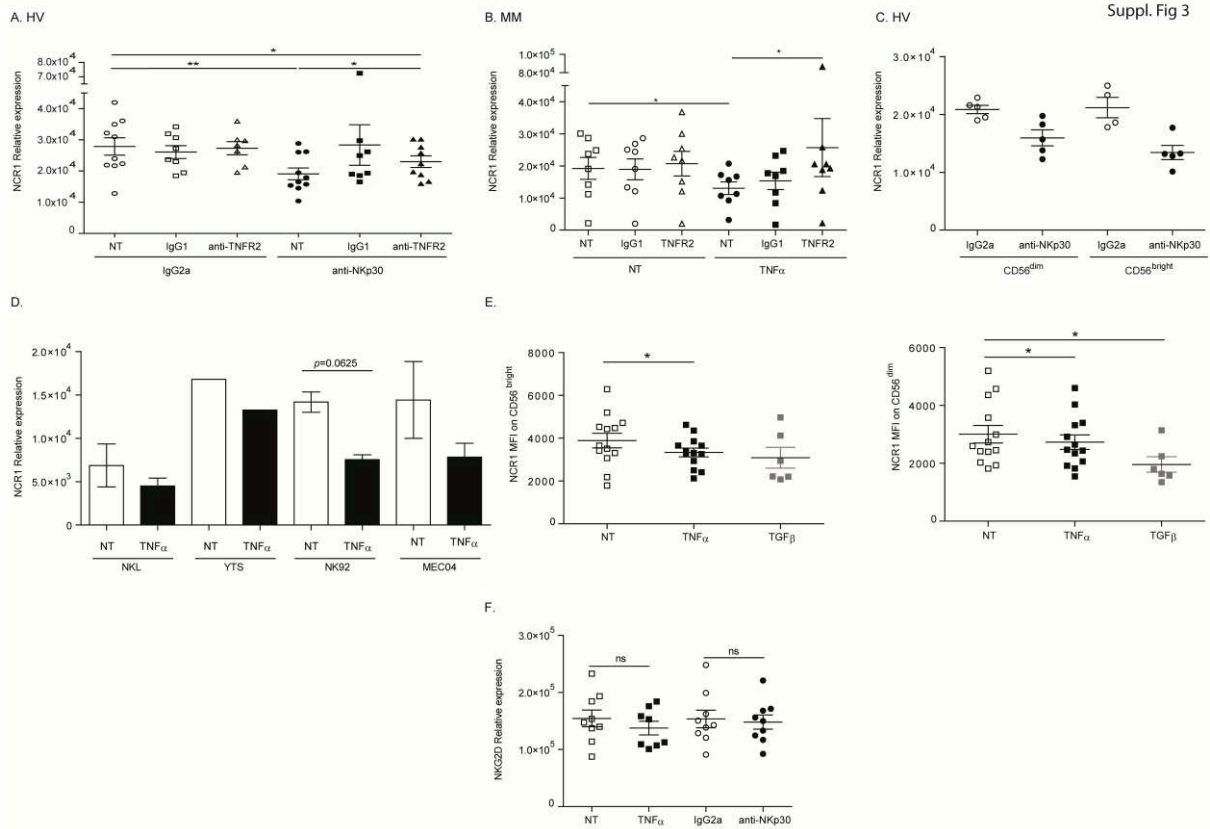
## Supplemental Figures



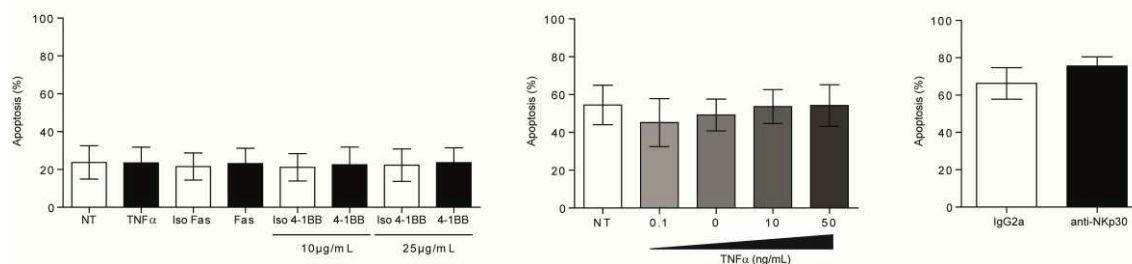
**Supplemental Figure 1. Segregation of gene products according to the c-kit prototypic oncogenic mutation in the GIST.** Heat map representation of microarray analyses of CD3<sup>+</sup>CD56<sup>bright</sup> NK cells from GIST patient tumors exhibiting or not a mutation in the c-kit exon 11 on about 20,000 gene products, the most significant hits contrasting the two groups according to the median of the whole cohort being depicted. Of note, for the genes products identified by several distinct probes, the most significant one was retained in the model. Significant p-values <0.05 are indicated on the right side for each significant gene product.



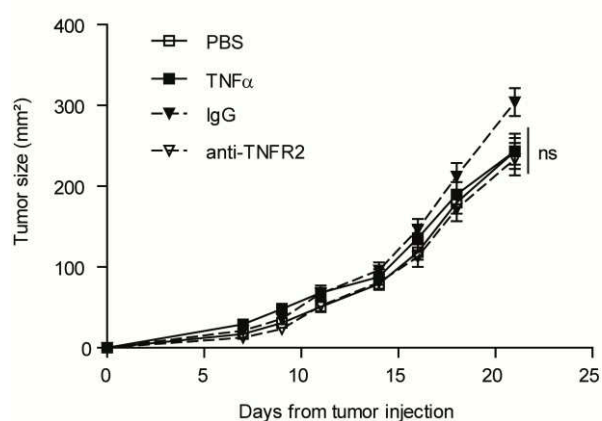
**Supplemental Figure 2. NK cell line stimulation by TNF $\alpha$  leads to markedly increased transcription of TRAF1 and BIRC3.** A. Regulation of expression of TRAF1 and BIRC3 in 8 HV post-stimulation with several TNF-family members at 12 h post-stimulation with 50 ng/mL of TNF $\alpha$  or saturating amounts of antibodies engaging 4-1BB or 5  $\mu$ g/mL of CD95 (or isotype control Abs). B. TRAF1 and BIRC3 expression in several NK cell lines 12 h post-TNF $\alpha$  stimulation. The RT-qPCR data from one to 3 experiments are depicted in the graphs, in triplicate wells. Graphs show the means  $\pm$  SEM of the relative expression normalized to  $\beta$ 2 microglobulin expression in NK cell lines. C. Idem as in Fig. 2A using blood NK cells purified according to the CD56 expression levels. Each dot represents one HV. Wilcoxon matched pairs test: \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001, ns: not significant.



**Supplemental Figure 3. Neutralizing the TNFR2 inhibits NKp30 or TNF $\alpha$ -induced downregulation of NCR1.** A. Same experiment as in Fig. 2B, blocking of the TNFR2 inhibits the downregulation of NCR1 after cross-linking of NKp30 in HV. B. In MM, neutralizing anti-TNFR2 Ab prevents downregulation of NCR1 post-TNF $\alpha$  stimulation. C-D. Same settings as in Suppl. Fig. 2C (C) or Suppl. Fig. 2B (D) displaying the level of NCR1 expression. E. NKp46 protein expression on the cell surface of NK cell CD56<sup>bright</sup> (left panel) or CD56<sup>dim</sup> (right panel) as in Fig. 3D. F. NKG2D expression level in HV in the same conditions described in Fig 2A. Wilcoxon matched pairs test: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ . ns: not significant.



**Supplemental Figure 4. TNF $\alpha$  or TNF family members fail to induce apoptosis of blood NK cells.** Same setting as in Suppl. Fig. 2A-B but monitoring annexin V/DAPI by flow cytometry at 24 h (left and middle panels) and 48 h (right panel). Trypan blue experiments corroborated the absence of effects of TNF $\alpha$  on proliferation and/or cell death of NK cells. Wilcoxon matched pairs test.



**Supplemental Figure 5. No significant impact of TNF $\alpha$  or TNFR2 blockade in NKp46 ligand negative tumor cells.** Subcutaneous growth of RMAS lymphoma over a kinetics of 3 weeks without treatment (PBS 1X injection) or with daily inoculation of 1  $\mu$ g of mouse rTNF $\alpha$  for 2 weeks or with 500 $\mu$ g of neutralizing anti-mouseTNFR2 Ab (or IgG1 isotype control Ab) twice a week for 2 weeks starting at day 7 post-tumor inoculation. Representative tumor kinetics of 5-6 mice/group: means  $\pm$  SEM of tumor sizes are depicted at each time points of measurement with a caliper. Two experiments yielding similar results. Two-way ANOVA statistical analyses. ns: not significant.

## Discussion

Ces dernières années, l'immunothérapie dans le traitement des cancers est devenue une voie privilégiée dans la recherche de stratégies thérapeutiques anti-cancéreuses. En effet, la complexité des tumeurs et leur grande hétérogénéité imposent non seulement de tuer les cellules tumorales mais également de réactiver le système immunitaire dans le microenvironnement tumoral. Malgré les efforts et améliorations des connaissances, la grande majorité des patients ne bénéficie pas encore de ces traitements. Ainsi, la recherche de biomarqueurs permettant la prédiction de la réponse d'un patient à une thérapie donnée est primordiale. Notre équipe a déjà montré dans des études précédentes la valeur pronostique de l'infiltrat des cellules NK chez les patients atteints de GIST (Rusakiewicz, Semeraro, et al. 2013) mais également celle du récepteur NKp30 et plus particulièrement de son isoforme NKp30c (Delahaye et al. 2011).

Dans le premier article, nous démontrons que le  $\Delta BC$ , le ratio de l'expression des isoformes NKp30b et NKp30c, permet de prédire la réponse à l'IM des patients GIST. De plus, les ligands solubles de NKp30, sB7-H6 et sBAG6 impactent également la survie des patients en réponse à l'IM. Besse et collègues ont d'ailleurs montré que sB7-H6 inhibait les cellules NK dans le CBNPC (Besse et al. 2016) tandis qu'un rôle similaire a été décrit dans le cancer de l'ovaire (Pesce et al. 2015) Ces ligands, présents dans le microenvironnement tumoral influencent le système immunitaire. Par ailleurs, nous montrons que ce microenvironnement est, lui, modulé par les cellules NK : le  $\Delta BC$  influence le profil cytokinique sécrété par les cellules NK. Les cellules  $\Delta BC^{\text{low}}$  sécrètent des cytokines immunosuppressives au contraire des  $\Delta BC^{\text{high}}$  produisant les cytokines Th1 (IFN $\gamma$  et TNF $\alpha$ ). Ces résultats font écho à ceux que notre équipe a publiés récemment dans le neuroblastome où nous avons également mis en évidence un rôle similaire de NKp30 et des ligands solubles ainsi qu'une corrélation entre une diminution de l'expression de NKp30 et une plus forte concentration du ligand soluble sB7-H6 (Semeraro et al. 2015). Semeraro et collègues notent également que l'IFN $\gamma$  (produit par les cellules NK de profil NKp30AB) diminue la transcription du gène codant B7-H6 alors que l'IL-10 (produit par les cellules NK de profil NKp30C) augmente son expression. En revanche le TNF $\alpha$  n'a aucun effet. Cette modulation de la fonctionnalité des NK par le microenvironnement tumoral peut être contrôlée par injection de cytokines comme nos

résultats le montrent lorsque l'ajout d'IFN $\alpha$ 2a réactive *ex vivo* des cellules NK et des LT issues de patients de profil  $\Delta BC^{\text{low}}$  en induisant une augmentation de deux à trois fois leur sécrétion d'IFN $\gamma$ . L'impact négatif des ligands solubles de NKp30 sB7-H6 et sBAG6 sur la survie des patients GIST (via l'inhibition de la fonctionnalité des cellules NK) laisse penser que le ciblage du microenvironnement tumoral serait une stratégie thérapeutique intéressante pour la réactivation des cellules NK. L'utilisation d'Ac bloquants anti-sB7-H6 ou anti-sBAG6 pourrait prévenir l'inhibition des cellules NK. Des Ac bispécifiques anti-B7H6 et anti-CD3 ont d'ailleurs été testés, entraînant une augmentation de la cytotoxicité anti-tumorale et la sécrétion d'IFN $\gamma$  des LT *in vitro* et *in vivo* (Wu et al. 2015). Nos résultats montrent également que l'expression du récepteur NKp30 lui-même est diminuée dans les cellules NK des GIST et ce phénomène a également été observé dans le neuroblastome et le mélanome (Messaoudene et al. 2016; Semeraro et al. 2015). Il y aurait donc un mécanisme de diminution de l'expression du récepteur activateur NKp30 par le microenvironnement tumoral, probablement par l'internalisation du NKp30 après fixation de ligands soluble sBAG6 ou SB7-H6, diminuant ainsi l'activation des cellules NK. Il serait intéressant d'observer *in vivo* l'action des ligands solubles de NKp30 dans un modèle de GIST (Balachandran et al. 2011) chez des souris humanisées. Ainsi, l'injection d'IFN $\alpha$ -2a et de l'Ac anti-TRAIL pourrait être testée *in vivo* de même que des Ac neutralisant anti-B7-H6 ou anti-BAG6. De plus, l'IFN $\alpha$ -2a et l'Ac anti-TRAIL augmentant la sécrétion d'IFN $\gamma$  par les cellules NK, il serait utile de déterminer si ces cellules NK présentent une augmentation de leur cytotoxicité.

Les cellules NK infiltrant les tumeurs se situent majoritairement non pas au centre de la tumeur mais dans le stroma péri-tumoral (Esendagli et al. 2008; Messaoudene et al. 2015; Platonova et al. 2011; Rusakiewicz, Semeraro, et al. 2013). Les cellules NK pénétrant au cœur de la tumeur sont anergiques, leur fonction serait donc inhibée par le microenvironnement tumoral. De nombreuses études montrent d'ailleurs que les cellules NK joueraient un rôle anti-tumoral via le contrôle de la dissémination métastatique plutôt que par l'élimination de la tumeur primaire (Aboud, Kingsmore, and Segal 1993; Talmadge et al. 1980). Cependant, de par leur fort potentiel antitumoral, il est primordial de réactiver les cellules NK présentes dans la tumeur. Leur activation ne nécessitant pas de TAA et de par leur capacité à sécréter des cytokines Th1, les cellules NK permettent également une activation des LT contre la tumeur.



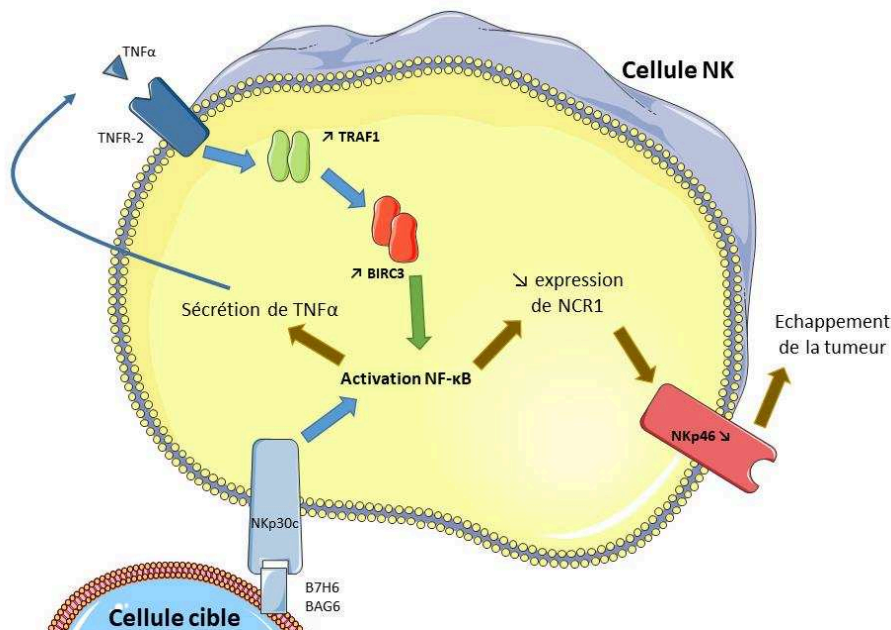
Dans notre second article, nous avons cherché à déterminer les mécanismes inhibiteurs des cellules NK par le microenvironnement tumoral. A partir d'un *microarray* réalisé sur des cellules NK infiltrant les GIST de 12 patients et les cellules NK du sang de ces mêmes patients, nous avons identifié une surexpression des gènes BIRC3 et TRAF1 dans les tumeurs des patients de profil NKp30c ( $\Delta BC^{low}$ ) que nous avons validée par qPCR. Par ailleurs, ces deux gènes étaient surexprimés *in vitro* en réponse au TNF $\alpha$ , à un Ac agoniste anti-NKp30 ou à un Ac agoniste anti-CD16, dans des cellules NK issues de VS comme de patients atteints de MM. De plus, l'expression du récepteur activateur NKp46 (aussi appelé NCR1) était diminuée au niveau de l'ARN messager (ARNm) et de la protéine. Ces effets sont partiellement dépendants du TNFR2 comme le montre notre blocage du TNFR2 à l'aide d'un Ac neutralisant qui induit une diminution des modulations transcriptionnelles générées par le TNF $\alpha$  mais également par le NKp30.

TRAF1 et BIRC3 sont des protéines de signalisation de différents récepteurs de la famille des TNFRSF dont TNFR2 fait partie. Le TNFR2, au contraire du TNFR1 est exprimé exclusivement sur les lymphocytes et induit un signal de prolifération après fixation du TNF $\alpha$  via la voie NF- $\kappa$ B (voir Introduction). TRAF1 appartient à la famille des protéines TRAF qui comprend 7 membres. Tous, sauf TRAF1, possèdent un domaine RING leur conférant leur fonction d'ubiquitine ligase. De plus, l'expression de TRAF1 est restreinte aux lymphocytes activés, aux DC et à certaines cellules épithéliales. De par son absence de domaine RING, TRAF1 est un régulateur négatif de l'activation de TNFR2. En effet, des souris déficientes en TRAF1 présentent des LT hyperprolifératifs (Tsitsikov et al. 2001). BIRC3 interagit indirectement avec TRAF1 lorsque celui-ci est associé avec TRAF2 après activation de TNFR2 mais il peut être aussi recruté par TNFR1 et régule négativement l'apoptose en promouvant l'activation de la voie NF- $\kappa$ B. Dans notre étude, la surexpression de TRAF1 et BIRC3 est associée à un phénotype suppressif dans les cellules NK de profil NKp30c. Cela pourrait être dû à l'activation de la voie NF- $\kappa$ B et son influence sur la signalisation des cytokines. En effet, nous avons montré que l'activation de NKp30 active la voie NF- $\kappa$ B de manière différente suivant les isoformes : NKp30a et NKp30b activent plus fortement la voie NF- $\kappa$ B que NKp30c qui active également la MAP kinase p38 (Delahaye et al. 2011). La voie NF- $\kappa$ B induit la sécrétion de cytokines Th1 par les cellules NK après stimulation par le TNF $\alpha$  mais également après activation du récepteur NKp30. Cependant NF- $\kappa$ B peut aussi conduire à la sécrétion de

cytokines Th2 (IL-4, IL-13, IL-10) comme c'est le cas de l'IL-33 produit par les cellules NK de la decidua (Hu et al. 2015). De plus, l'IL-33 est responsable d'une diminution de l'expression des récepteurs activateurs NKp30 et NKG2D et de la surexpression du récepteur inhibiteur KIR2DL1. Ces résultats rappellent notre étude dans laquelle nous observons une diminution de l'expression du récepteur activateur NKp46 (mais pas de NKG2D). De plus, nous avons rapporté que l'expression génique et protéique de NKp30 était diminuée dans les GIST (Delahaye et al. 2011) ainsi que dans le NSCLC où une diminution de l'expression de NCR1 a également été observée (Fend et al. 2017). NKp46 est considéré comme un récepteur activateur essentiel pour la fonctionnalité des cellules NK *in vitro* mais également *in vivo* où son rôle dans le contrôle de la dissémination métastatique a été rapporté par Glasner et collègues (Glasner et al. 2012). Ainsi une diminution de son expression pourrait être un mécanisme d'évasion pour les tumeurs, de manière similaire au mécanisme d'évasion du VIH qui induit une baisse de l'expression de NCR1 à la surface des cellules NK (Parsons et al. 2013).

La stimulation par le TNF $\alpha$  de cellules NK induit une production d'IFN $\gamma$  via le TNFR2 (Almishri et al. 2016). La voie du TNF $\alpha$  apparaît donc primordiale pour l'activation des cellules NK. Ainsi, le traitement par un Ac anti-TNF $\alpha$  de patients atteints de lymphome B induit une altération des fonctions de leurs cellules NK (Nocturne et al. 2017). Nos résultats montrent une influence du profil NKp30 dans la réponse des cellules NK à la stimulation par le TNF $\alpha$  car nous observons une sécrétion d'IFN $\gamma$  plus importante par les cellules NK de profil NKp30C que par les NKp30AB. Dans un contexte d'infection au virus de l'hépatite C (HCV), les cellules NK intrahépatiques NKp44<sup>+</sup> présentent une production de TNF $\alpha$  plus importante que celles NKp44<sup>-</sup> et leur présence est corrélée positivement avec la charge virale de HCV et la fibrose hépatique (Nel et al. 2016). Cette étude montre un impact délétère des NK producteurs de TNF $\alpha$  dans le foie lors d'une hépatite C chronique. Ces résultats, renforcés par nos propres travaux, démontrent que les cellules NK, de par leur production de TNF $\alpha$ , peuvent avoir un rôle protumoral en participant à l'inflammation chronique durant l'oncogenèse. Un autre indice du rôle délétère du TNF $\alpha$  a été apporté par l'équipe de Smyth qui a décrit un mécanisme de dédifférenciation de cellules NK en ILC-1 productrices de TNF $\alpha$ , en présence de TGF $\beta$ . Ces ILC-1 présentent de faibles capacités antitumorales, notamment dans le GIST (Gao Y, Smyth MJ, Nat Immunol, in press).

L'action du microenvironnement tumoral dans l'échappement des tumeurs passe par l'induction d'un environnement immunosuppresseur via la sécrétion de facteurs par les cellules tumorales elles-mêmes ou par le recrutement de cellules immunitaires favorisant cette immunosuppression. Dans notre étude, les cellules NK intratumorales sont au cœur d'un mécanisme d'immunosuppression. En effet, lorsqu'elles sont activées via leur récepteur NKp30, elles sécrètent des cytokines Th1 (IFN $\gamma$  et TNF $\alpha$ ). Le TNF $\alpha$  se fixe de manière autocrine sur le TNFR2 et entraîne dans les cellules de profil NKp30C une surexpression des gènes BIRC3 et TRAF1 via la voie du TNFR2 et une diminution de l'expression de NCR1 via la voie NF- $\kappa$ B. Cela induirait plus particulièrement chez les cellules NK de profil NKp30C au détriment des profils NKp30AB, une expression de cytokines Th1, IFN $\gamma$  et TNF $\alpha$  dans une boucle de rétrocontrôle positif générant une production de TNF $\alpha$  chronique et donc une diminution toujours plus importante de l'expression du récepteur activateur NCR1 (**Figure 12**). Il serait intéressant de déterminer si ce mécanisme, en combinaison avec le TGF $\beta$  n'induirait pas également une dédifférenciation des cellules NK en ILC-1. De plus, l'étude de la signalisation des voies TNFR2 et NKp46 dans des VS mais également des GIST permettrait de déterminer l'interaction entre ces deux voies.



**Figure 12** : Schéma récapitulatif de la boucle de rétrocontrôle NKp30/TNFR2/BIRC3/TRAF1 induisant une diminution de l'expression de NKp46 chez les cellules NK de profil NKp30c. Lorsqu'une cellule NK s'active via le NKp30c, il y a activation de la voie NF- $\kappa$ B induisant la sécrétion de TNF $\alpha$ . Ce dernier va se fixer de manière autocrine au récepteur TNFR2 qui alors induit l'augmentation de l'expression des molécules de signalisation TRAF1 et BIRC3 conduisant à l'activation de la voie NF- $\kappa$ B. Ainsi, l'expression du gène NCR1 codant le récepteur activateur NKp46 est diminuée ainsi que son expression membranaire permettant une baisse de l'activation des cellules NK.

## Conclusion et perspectives

La découverte des Ac bloquant les inhibiteurs des points de contrôle immunitaire (anti-CTLA-4 et anti-PD-1/PD-L1) il y a une dizaine d'années a conduit à un renouveau des stratégies anti-tumorales basées sur les immunothérapies. Afin d'optimiser au mieux la réussite de ces traitements, une connaissance précise des tumeurs de chaque patient est nécessaire. A l'ère de la médecine personnalisée, définir des biomarqueurs fiables pour la réponse à un traitement est primordial. Cette approche nous a conduit à caractériser les isoformes du récepteur NKp30, récepteur activateur des cellules NK, ainsi que les ligands solubles de NKp30 sB7-H6 et sBAG6 comme marqueurs prédictifs de la réponse à l'IM dans le traitement des GIST. Nos recherches renforcent le rôle capital des cellules NK dans l'immunité anti-tumorale. En effet, l'importance antitumorale des cellules NK et plus spécifiquement de NKp30 a été démontrée dans de nombreux cancers comme le neuroblastome (Semeraro et al. 2015), le cancer colorectal, le cancer du rein (Remark et al. 2013) ou encore les leucémies myéloïdes aiguës (Ruggeri et al. 2002). Le ciblage des cellules NK dans le contexte de l'immunothérapie apparaît donc prometteur pour ces tumeurs. Activer les cellules NK à l'aide de différents anticorps est une piste en cours d'exploration avec le ciblage par exemple du récepteur activateur NKG2D (von Strandmann et al. 2006) ou du récepteur inhibiteur NKG2A (McWilliams et al. 2016). L'isoforme NKp30c impactant négativement le pronostic des patients GIST, le ciblage de cette isoforme immunosuppressive pourrait améliorer la survie des patients. Ainsi, nous avons montré que la diminution de l'expression de NKp30c par des petits ARN interférants (siRNA) restaurait la sécrétion de cytokines Th1 par les cellules NK de profil NKp30c (Semeraro et al. 2015). Induire un changement dans l'expression des isoformes de NKp30 en faveur des isoformes NKp30a ou NKp30b serait également un moyen de rétablir la fonctionnalité antitumorale des cellules NK. Des résultats non publiés de notre équipe suggèrent que les inhibiteurs des histones désacétylases (HDACi) ou des agents déméthylants seraient capables d'induire cette commutation dans l'expression des isoformes de NKp30. De plus, les HDACi se sont montrés capables d'induire une diminution de l'expression de B7-H6 *in vitro* (Fiegler et al. 2013).

L'IM est capable d'activer indirectement les cellules NK via l'activation des DC. Cependant, le vemurafenib, un autre inhibiteur de tyrosine kinase ciblant BRAF, s'est révélé capable d'activer directement les cellules NK et améliorer la réponse de patients atteints de mélanome (De Andrade et al. 2014). Ainsi l'utilisation combinée de TKI avec d'autres molécules comme des Ac bloquants l'anti-CTLA-4 ou l'anti-PD-1 serait une stratégie intéressante : les TKI ciblant la tumeur tout en favorisant l'activation des cellules NK tandis que les Ac anti-CTLA-4 ou anti-PD-1 permettent l'activation des LT dans la tumeur. Cependant, bien que reposant majoritairement sur leurs effets sur les LT, les Ac anti-CTLA-4 et anti-PD-1 ciblent aussi les cellules NK qui expriment CTLA-4 et PD-1. Ainsi, une meilleure compréhension de l'impact de ces Ac sur les cellules NK aiderait à améliorer leur utilisation.

Nos résultats montrent également l'importance du microenvironnement tumoral et notamment du TNF $\alpha$  dans la fonction des cellules NK. Nous montrons que le TNF $\alpha$  est au cœur d'un nouveau mécanisme inhibiteur des cellules NK via la voie TNFR2/BIRC3/TRAF1. Ainsi, chez la souris, l'inhibition du TNF $\alpha$  par l'Etanercept (une protéine de fusion comprenant la partie extracellulaire du TNFR2 lié à un fragment Fc d'une IgG1) diminue la dissémination métastatique d'une lignée tumorale sensible aux cellules NK. Il apparaît donc que le ciblage du TNF $\alpha$  dans certains cancers pourrait restaurer l'activité antitumorale des cellules NK. Le ciblage d'autres cytokines inhibitrices, comme le TGF $\beta$ , où l'injection de cytokines stimulatrices comme l'IL-12 ou l'IL-18 ont déjà démontré des résultats intéressants (Romee, Leong, and Fehniger 2014). Combiner ces différentes approches permettrait de rétablir un microenvironnement antitumoral favorable aux cellules NK.

Enfin, le séquençage des ARNm des cellules présentes dans le microenvironnement tumoral a permis de définir le profil transcriptomique des tumeurs mais également des cellules immunitaires dans un cancer donné. Nous avons pu mettre en évidence grâce à cette technique le rôle délétère de la voie TNF $\alpha$ /TNFR2/BIRC3/TRAF1 dans les cellules NK, initialement dans le GIST. Ces résultats ont démontré pour la première fois un rôle négatif du TNF $\alpha$  sur les cellules NK. Récemment, Nirschl et collègues ont démontré un rôle de l'IFN $\gamma$  dans la résistance de mélanome primaire à l'immunité antitumorale via l'expression de la protéine *suppressor-of-cytokine-signaling 2* (SOCS2) dans des phagocytes infiltrant les tumeurs (Nirschl et al. 2017).

Malgré la découverte des cellules NK il y a 40 ans, leurs mécanismes d'action et leur fonctionnement ne sont pas pleinement compris et exploités en clinique. Cela peut s'expliquer par les difficultés à trouver des modèles appropriés, l'hétérogénéité de la population des cellules NK (cytotoxiques, sécrétrices, mémoires, ...) et par les différences entre les cellules NK murines et celles humaines, constituant un obstacle majeur pour l'application clinique des découvertes sur les cellules NK. En effet, par exemple le récepteur NKp30 n'existe pas chez la souris. Ainsi pour notre étude chez la souris, il serait intéressant de réaliser les mêmes expériences chez des souris humanisées, même si ces dernières présentent également des limites (injection d'IL-15 humaine nécessaire pour l'homéostasie des cellules NK) (Li and Di Santo 2016). Néanmoins, plusieurs thérapies basées sur les cellules NK sont testées actuellement (Conlon et al. 2015; Kohrt et al. 2011; Nguyen et al. 2009). De plus, une approche par étape ciblant dans un premier temps les cellules NK puis les LT devrait être envisagée : l'élimination des cellules tumorales et la production d'IFN $\gamma$  par les cellules NK favoriserait très certainement le développement d'une réponse antigène spécifique des LT.

Les résultats présentés dans cette thèse démontrent l'importance des cellules NK et plus particulièrement des isoformes du récepteur activateur NKp30 dans la survie des patients GIST et présentent également pour la première fois un rôle délétère de la voie TNF $\alpha$ /TNFR2/BIRC3/TRAF1 pour la fonctionnalité antitumorale des cellules NK. Ainsi, le ciblage de cette nouvelle voie mais également des isoformes de NKp30 représentent des nouvelles stratégies thérapeutiques pour la restauration des capacités antitumorales des cellules NK.

# Bibliographie

- Abdul-Careem, Mohamed F. et al. 2012. "Genital HSV-2 Infection Induces Short-Term NK Cell Memory." *PLOS ONE* 7(3):e32821. Retrieved (<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032821>).
- Aboud, M., S. Kingsmore, and S. Segal. 1993. "Role of Natural Killer Cells in Controlling Local Tumor Formation and Metastatic Manifestation of Different 3LL Lewis Lung Carcinoma Cell Clones." *Natural immunity* 12(1):17–24.
- Abulayha, Abdulmunem, Amin Bredan, Hesham El Enshasy, and Ian Daniels. 2014. "Rituximab: Modes of Action, Remaining Dispute and Future Perspective." *Future Oncology* 10(15):2481–92. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.2217/fon.14.146>).
- Agnello, Davide et al. 2003. "Cytokines and Transcription Factors That Regulate T Helper Cell Differentiation: New Players and New Insights." *Journal of clinical immunology* 23(3):147–61.
- Allen, Michael and J. Louise Jones. 2011. "Jekyll and Hyde: The Role of the Microenvironment on the Progression of Cancer." *Journal of Pathology* 223(2):162–76.
- Almishri, Wagdi, Tania Santodomingo-garzon Tyson, Le Danuta, Christopher H. Mody, and Mark G. Swain. 2016. "TNF $\alpha$  Augments Cytokine-Induced NK Cell IFN $\gamma$  Production through TNFR2." 6:617–29.
- Anderson, C. L., L. Shen, D. M. Eicher, M. D. Wewers, and J. K. Gill. 1990. "Phagocytosis Mediated by Three Distinct Fc Gamma Receptor Classes on Human Leukocytes." *The Journal of experimental medicine* 171(4):1333–45.
- De Andrade, Lucas Ferrari et al. 2014. "Natural Killer Cells Are Essential for the Ability of BRAF Inhibitors to Control BRAFV600E-Mutant Metastatic Melanoma." *Cancer Research* 74(24):7298–7308.
- Andrews, Daniel M. et al. 2010. "Innate Immunity Defines the Capacity of Antiviral T Cells to Limit Persistent Infection." *The Journal of experimental medicine* 207(6):1333–43.

- Anfossi, Nicolas et al. 2006. "Human NK Cell Education by Inhibitory Receptors for MHC Class I." *Immunity* 25(2):331–42. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2006.06.013>).
- Anon. 2010. "Comparison of Two Doses of Imatinib for the Treatment of Unresectable or Metastatic Gastrointestinal Stromal Tumors: A Meta-Analysis of 1,640 Patients." *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 28(7):1247–53.
- Arnon, Tal I. et al. 2001. "Recognition of Viral Hemagglutinins by NKp44 but Not by NKp30." *European Journal of Immunology* 31(9):2680–89. Retrieved ([http://dx.doi.org/10.1002/1521-4141\(200109\)31:9%3C2680::AID-IMMU2680%3E3.0.CO;2-A](http://dx.doi.org/10.1002/1521-4141(200109)31:9%3C2680::AID-IMMU2680%3E3.0.CO;2-A)).
- Arnon, Tal I. et al. 2005. "Inhibition of the NKp30 Activating Receptor by pp65 of Human Cytomegalovirus." 6(5):515–23.
- Arnon, Tal I., Gal Markel, and Ofer Mandelboim. 2006. "Tumor and Viral Recognition by Natural Killer Cells Receptors." *Seminars in cancer biology* 16(5):348–58.
- Artis, David and Hergen Spits. 2015. "The Biology of Innate Lymphoid Cells." *Nature* 517(7534):293–301. Retrieved (<http://www.nature.com/doi/10.1038/nature14189>).
- Ashkenazi, Avi. 2002. "Targeting Death and Decoy Receptors of the Tumour-Necrosis Factor Superfamily." *Nat Rev Cancer* 2(6):420–30. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1038/nrc821>).
- Aspord, Caroline et al. 2007. "Breast Cancer Instructs Dendritic Cells to Prime Interleukin 13-secreting CD4+ T Cells That Facilitate Tumor Development." *Journal of Experimental Medicine* 204(5):1037–47. Retrieved (<http://jem.rupress.org/content/204/5/1037>).
- Augugliaro, Raffaella et al. 2003. "Selective Cross-Talk among Natural Cytotoxicity Receptors in Human Natural Killer Cells." *European journal of immunology* 33(5):1235–41.
- Bakema, Jantine E. and Marjolein van Egmond. 2014. "Fc Receptor-Dependent Mechanisms



of Monoclonal Antibody Therapy of Cancer.” *Current topics in microbiology and immunology* 382:373–92.

Balachandran, Vinod P. et al. 2011. “Imatinib Potentiates Antitumor T Cell Responses in Gastrointestinal Stromal Tumor through the Inhibition of Ido.” *Nature medicine* 17(9):1094–1100.

Balkwill, Frances, Kellie A. Charles, and Alberto Mantovani. 2005. “Smoldering and Polarized Inflammation in the Initiation and Promotion of Malignant Disease.” *Cancer Cell* 7(3):211–17.

Balsamo, Mirna et al. 2013. “Hypoxia Downregulates the Expression of Activating Receptors Involved in NK-Cell-Mediated Target Cell Killing without Affecting ADCC.” *European journal of immunology* 43(10):2756–64.

Barnett, Christine M., Christopher L. Corless, and Michael C. Heinrich. 2013. “Gastrointestinal Stromal Tumors: Molecular Markers and Genetic Subtypes.” *Hematology/oncology clinics of North America* 27(5):871–88.

Bauer, Christian A. et al. 2014. “Dynamic Treg Interactions with Intratumoral APCs Promote Local CTL Dysfunction.” *Journal of Clinical Investigation* 124(6):2425–40.

Bauer, S. et al. 1999. “Activation of NK Cells and T Cells by NKG2D, a Receptor for Stress-Inducible MICA.” *Science (New York, N.Y.)* 285(5428):727–29.

Baychelier, Florence et al. 2013. “Identification of a Cellular Ligand for the Natural Cytotoxicity Receptor NKp44.” *Blood* 122(17):2935 LP-2942. Retrieved (<http://www.bloodjournal.org/content/122/17/2935.abstract>).

Benchetrit, Fabrice et al. 2002. “Interleukin-17 Inhibits Tumor Cell Growth by Means of a T-Cell-Dependent Mechanism.” *Blood* 99(6):2114–21.

Benson, Don M. et al. 2012. “A Phase 1 Trial of the Anti-KIR Antibody IPH2101 in Patients with Relapsed/refractory Multiple Myeloma.” *Blood* 120(22):4324 LP-4333. Retrieved (<http://www.bloodjournal.org/content/120/22/4324.abstract>).

Benson, Don M.Jr et al. 2011. “IPH2101, a Novel Anti-Inhibitory KIR Antibody, and Lenalidomide Combine to Enhance the Natural Killer Cell versus Multiple Myeloma

Effect." *Blood* 118(24):6387–91.

Bernink, Jochem H. et al. 2013. "Human Type 1 Innate Lymphoid Cells Accumulate in Inflamed Mucosal Tissues." *Nat Immunol* 14(3):221–29. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1038/ni.2534>).

Bertucci, Francois et al. 2015. "PDL1 Expression Is an Independent Prognostic Factor in Localized GIST." *Oncoimmunology* 4(5):e1002729.

Besse, Benjamin et al. 2016. "Dendritic Cell-Derived Exosomes as Maintenance Immunotherapy after First Line Chemotherapy in NSCLC." *Oncolmmunology* 5(4):e1071008. Retrieved (<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/2162402X.2015.1071008>).

Beziat, Vivien et al. 2012. "CMV Drives Clonal Expansion of NKG2C+ NK Cells Expressing Self-Specific KIRs in Chronic Hepatitis Patients." *European journal of immunology* 42(2):447–57.

Biassoni, R. et al. 1996. "The Human Leukocyte Antigen (HLA)-C-Specific 'activatory' or 'inhibitory' natural Killer Cell Receptors Display Highly Homologous Extracellular Domains but Differ in Their Transmembrane and Intracytoplasmic Portions." *The Journal of experimental medicine* 183(2):645–50.

Birkeland, Sven A. et al. 1995. "Cancer Risk after Renal Transplantation in the Nordic Countries, 1964–1986." *International Journal of Cancer* 60(2):183–89. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1002/ijc.2910600209>).

Bix, Mark et al. 1991. "Rejection of Class I MHC-Deficient Haemopoietic Cells by Irradiated MHC-Matched Mice." *Nature* 349(6307):329–31. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1038/349329a0>).

Björkström, Niklas K. et al. 2010. "Expression Patterns of NKG2A, KIR, and CD57 Define a Process of CD56<sup>+</sup> NK-Cell Differentiation Uncoupled from NK-Cell Education." *Blood* 116(19):3853–3864. Retrieved (<http://www.bloodjournal.org/content/116/19/3853.abstract>).

Björkström, Niklas K. et al. 2011. "Rapid Expansion and Long-Term Persistence of Elevated

- NK Cell Numbers in Humans Infected with Hantavirus." *The Journal of Experimental Medicine* 208(1):13 LP-21. Retrieved (<http://jem.rupress.org/content/208/1/13.abstract>).
- Blake, Stephen J. et al. 2016. "Suppression of Metastases Using a New Lymphocyte Checkpoint Target for Cancer Immunotherapy." *Cancer Discovery* 6(4):446 LP-459. Retrieved (<http://cancerdiscovery.aacrjournals.org/content/6/4/446.abstract>).
- Blank-Voorthuis, C. J. et al. 1993. "Clustered CD3/TCR Complexes Do Not Transduce Activation Signals after Bispecific Monoclonal Antibody-Triggered Lysis by Cytotoxic T Lymphocytes via CD3." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 151(6):2904–14.
- Blay, J. Y., D. Perol, and A. Le Cesne. 2012. "Imatinib Rechallenge in Patients with Advanced Gastrointestinal Stromal Tumors." *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 23(7):1659–65.
- Blay, Jean-Yves et al. 2007. "Prospective Multicentric Randomized Phase III Study of Imatinib in Patients with Advanced Gastrointestinal Stromal Tumors Comparing Interruption versus Continuation of Treatment beyond 1 Year: The French Sarcoma Group." *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 25(9):1107–13.
- Borg, Christophe et al. 2004. "Novel Mode of Action of c-Kit Tyrosine Kinase Inhibitors Leading to NK Cell – Dependent Antitumor Effects." *The Journal of clinical investigation* 114(3):379–88.
- Borges, L., M. L. Hsu, N. Fanger, M. Kubin, and D. Cosman. 1997. "A Family of Human Lymphoid and Myeloid Ig-like Receptors, Some of Which Bind to MHC Class I Molecules." *The Journal of Immunology* 159(11):5192 LP-5196. Retrieved (<http://www.jimmunol.org/content/159/11/5192.abstract>).
- Boshoff, Chris and Robin Weiss. 2002. "Aids-Related Malignancies." *Nat Rev Cancer* 2(5):373–82. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1038/nrc797>).
- Bottino, Cristina et al. 2003. "Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as Cell Surface Ligands for the Human DNAM-1 (CD226) Activating Molecule." *The Journal of experimental medicine* 198(4):557–67.

- Brandt, Cameron S. et al. 2009. "The B7 Family Member B7-H6 Is a Tumor Cell Ligand for the Activating Natural Killer Cell Receptor NKp30 in Humans." 206(7):1495–1503.
- Braud, V. M. et al. 1998. "HLA-E Binds to Natural Killer Cell Receptors CD94/NKG2A, B and C." *Nature* 391(6669):795–99.
- Brodin, Petter, Klas Kärre, and Petter Höglund. 2017. "NK Cell Education: Not an on-off Switch but a Tunable Rheostat." *Trends in Immunology* 30(4):143–49. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2009.01.006>).
- van den Broek, M. E. et al. 1996. "Decreased Tumor Surveillance in Perforin-Deficient Mice." *The Journal of experimental medicine* 184(5):1781–90. Retrieved (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2192859&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- van der Bruggen, P. et al. 1991. "A Gene Encoding an Antigen Recognized by Cytolytic T Lymphocytes on a Human Melanoma." *Science* 254(5038):1643 LP-1647. Retrieved (<http://science.sciencemag.org/content/254/5038/1643.abstract>).
- Bryceson, Yenan T. and Hans Gustaf Ljunggren. 2008. "Tumor Cell Recognition by the NK Cell Activating Receptor NKG2D." *European Journal of Immunology* 38(11):2957–61.
- Bryceson, Yenan T., Michael E. March, Hans-Gustaf Ljunggren, and Eric O. Long. 2006. "Activation, Coactivation, and Costimulation of Resting Human Natural Killer Cells." *Immunological reviews* 214:73–91.
- Budhu, Anuradha et al. 2006. "Prediction of Venous Metastases, Recurrence, and Prognosis in Hepatocellular Carcinoma Based on a Unique Immune Response Signature of the Liver Microenvironment." *Cancer Cell* 10(2):99–111.
- Bunt, S. K., P. Sinha, V. K. Clements, J. Leips, and S. Ostrand-Rosenberg. 2006. "Inflammation Induces Myeloid-Derived Suppressor Cells That Facilitate Tumor Progression." *The Journal of Immunology* 176(1):284–90. Retrieved (<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.176.1.284>).
- Buonocore, Sofia et al. 2010. "Innate Lymphoid Cells Drive Interleukin-23-Dependent Innate Intestinal Pathology." *Nature* 464(7293):1371–75. Retrieved

(<http://dx.doi.org/10.1038/nature08949>).

Burnet, M. 1957. "Cancer; a Biological Approach. I. The Processes of Control." *British medical journal* 1(5022):779–86. Retrieved

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13404306><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1973174>).

Burnet, M. 1964. "IMMUNOLOGICAL FACTORS IN THE PROCESS OF CARCINOGENESIS." *British medical bulletin* 20:154–58.

Caligiuri, Michael a. 2008. "Human Natural Killer Cells." *Bone* 112(3):461–69.

Cameron, Silke, Marieke Gieselmann, Martina Blaschke, Giuliano Ramadori, and Laszlo Fuzesi. 2014. "Immune Cells in Primary and Metastatic Gastrointestinal Stromal Tumors (GIST)." *International journal of clinical and experimental pathology* 7(7):3563–79.

Campbell, James J. et al. 2001. "Unique Subpopulations of CD56<sup>+</sup> NK and NK-T Peripheral Blood Lymphocytes Identified by Chemokine Receptor Expression Repertoire." *The Journal of Immunology* 166(11):6477 LP-6482. Retrieved (<http://www.jimmunol.org/content/166/11/6477.abstract>).

Campbell, Kerry S. and Amanda K. Purdy. 2011. "Structure/function of Human Killer Cell Immunoglobulin-like Receptors: Lessons from Polymorphisms, Evolution, Crystal Structures and Mutations." *Immunology* 132(3):315–25.

Cantoni, Claudia et al. 1999. "NKp44, A Triggering Receptor Involved in Tumor Cell Lysis by Activated Human Natural Killer Cells, Is a Novel Member of the Immunoglobulin Superfamily ." *The Journal of Experimental Medicine* 189(5):787–96. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2192947/>).

Carosella, Edgardo D., Nathalie Rouas-Freiss, Diana Tronik-Le Roux, Philippe Moreau, and Joel LeMaoult. 2015. "HLA-G: An Immune Checkpoint Molecule." *Advances in immunology* 127:33–144.

Carrega, Paolo et al. 2008. "Natural Killer Cells Infiltrating Human Nonsmall-Cell Lung Cancer Are Enriched in CD56 Bright CD16(-) Cells and Display an Impaired Capability to Kill Tumor Cells." *Cancer* 112(4):863–75.

- Carswell, E. A. et al. 1975. "An Endotoxin-Induced Serum Factor That Causes Necrosis of Tumors." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72(9):3666–70.
- Cartron, Guillaume et al. 2002. "Therapeutic Activity of Humanized Anti-CD20 Monoclonal Antibody and Polymorphism in IgG Fc Receptor Fcγ3 Gene." *Blood* 99(3):754–58.
- Cassatella, M. A. et al. 1989. "Fc γ3 R(CD16) Interaction with Ligand Induces Ca<sup>2+</sup> Mobilization and Phosphoinositide Turnover in Human Natural Killer Cells. Role of Ca<sup>2+</sup> in Fc γ3 R(CD16)-Induced Transcription and Expression of Lymphokine Genes." *The Journal of experimental medicine* 169(2):549–67.
- Cassier, Philippe A. and Jean Yves Blay. 2011. "Gastrointestinal Stromal Tumors of the Stomach and Duodenum." *Current Opinion in Gastroenterology* 27(6):571–75. Retrieved (<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00001574-201111000-00015>).
- Castriconi, Roberta et al. 2003. "Transforming Growth Factor β1 Inhibits Expression of NKG2D and NKG2C Receptors: Consequences for the NK-Mediated Killing of Dendritic Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(7):4120–25.
- Cella, Marina et al. 2009. "A Human Natural Killer Cell Subset Provides an Innate Source of IL-22 for Mucosal Immunity." *Nature* 457(7230):722–25. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1038/nature07537>).
- Cerwenka, Adelheid and Lewis L. Lanier. 2016. "Natural Killer Cell Memory in Infection, Inflammation and Cancer." *Nature Reviews Immunology* 16(2):112–23. Retrieved (<http://www.nature.com/doi/10.1038/nri.2015.9>).
- Chalifour, Anick et al. 2009. "A Role for Cis Interaction between the Inhibitory Ly49A Receptor and MHC Class I for Natural Killer Cell Education." *Immunity* 30(3):337–47.
- Chan, C. J. et al. 2014. "The Receptors CD96 and CD226 Oppose Each Other in the Regulation of Natural Killer Cell Functions." *Nat Immunol* 15(5):431–38. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24658051>).

- Chau, Ian. 2017. "Clinical Development of PD-1/PD-L1 Immunotherapy for Gastrointestinal Cancers: Facts and Hopes." *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*.
- Chen, C. et al. 2006. "Activating KIR Genes Are Associated with CMV Reactivation and Survival after Non-T-Cell Depleted HLA-Identical Sibling Bone Marrow Transplantation for Malignant Disorders." *Bone marrow transplantation* 38(6):437–44.
- Chen, Lei L. et al. 2012. "Exploiting Antitumor Immunity to Overcome Relapse and Improve Remission Duration." *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 61(7):1113–24.
- Chester, Cariad, Katherine Fritsch, and Holbrook E. Kohrt. 2015. "Natural Killer Cell Immunomodulation: Targeting Activating, Inhibitory, and Co-Stimulatory Receptor Signaling for Cancer Immunotherapy." *Frontiers in Immunology* 6(DEC):1–9.
- Chua, Hui Lin, Yuri Serov, and Zacharie Brahmi. 2004. "Regulation of FasL Expression in Natural Killer Cells." *Human Immunology* 65(4):317–27.
- Clark, Jr. Wallace H. et al. 1989. "Model Predicting Survival in Stage I Melanoma Based on Tumor Progression." *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 81(24):1893. Retrieved (+).
- Clarke, Michael F. et al. 2006. "Cancer Stem Cells - Perspectives on Current Status and Future Directions: AACR Workshop on Cancer Stem Cells." *Cancer Research* 66(19):9339–44.
- Clemente, C. G. et al. 1996. "Prognostic Value of Tumor Infiltrating Lymphocytes in the Vertical Growth Phase of Primary Cutaneous Melanoma." *Cancer* 77:1303–10.
- Coca, Santiago et al. 1997. "The Prognostic Significance of Intratumoral Natural Killer Cells in Patients with Colorectal Carcinoma." *Cancer* 79(12):2320–28. Retrieved (<http://doi.wiley.com/10.1002/%28SICI%291097-0142%2819970615%2979%3A12%3C2320%3A%3AAID-CNCR5%3E3.0.CO%3B2-P>).
- Cohnen, André et al. 2013. "Surface CD107a/LAMP-1 Protects Natural Killer Cells from Degranulation-Associated Damage." *Blood* 122(8):1411–18. Retrieved (<http://www.bloodjournal.org/content/122/8/1411>).
- Coley, William B. 1910. "The Treatment of Inoperable Sarcoma by Bacterial Toxins (the

- Mixed Toxins of the Streptococcus Erysipelas and the Bacillus Prodigiosus).” *Proceedings of the Royal Society of Medicine* 3(Surg Sect):1–48.
- Collins, D. M. et al. 2012. “Trastuzumab Induces Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity (ADCC) in HER-2-Non-Amplified Breast Cancer Cell Lines.” *Annals of Oncology* 23(7):1788–95. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mdr484>).
- Conlon, Kevin C. et al. 2015. “Redistribution, Hyperproliferation, Activation of Natural Killer Cells and CD8 T Cells, and Cytokine Production during First-in-Human Clinical Trial of Recombinant Human Interleukin-15 in Patients with Cancer.” *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 33(1):74–82.
- Cooper, Megan A., Todd A. Fehniger, Sarah C. Turner, et al. 2001. “Human Natural Killer Cells: A Unique Innate Immunoregulatory Role for the CD56bright Subset.” *Blood* 97(10):3146–51. Retrieved (<http://www.bloodjournal.org/content/97/10/3146>).
- Cooper, Megan A. et al. 2009. “Cytokine-Induced Memory-like Natural Killer Cells.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(6):1915–19.
- Cooper, Megan A., Todd A. Fehniger, and Michael A. Caligiuri. 2001. “The Biology of Human Natural Killer-Cell Subsets.” *Trends in Immunology* 22(11):633–40. Retrieved ([http://dx.doi.org/10.1016/S1471-4906\(01\)02060-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1471-4906(01)02060-9)).
- Corless, Christopher L., Jonathan A. Fletcher, and Michael C. Heinrich. 2004. “Biology of Gastrointestinal Stromal Tumors.” *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 22(18):3813–25.
- Costello, Regis T. et al. 2002. “Defective Expression and Function of Natural Killer Cell-Triggering Receptors in Patients with Acute Myeloid Leukemia.” *Blood* 99(10):3661–67.
- Crane, Courtney A. et al. 2014. “Immune Evasion Mediated by Tumor-Derived Lactate Dehydrogenase Induction of NKG2D Ligands on Myeloid Cells in Glioblastoma Patients.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(35):12823–28.
- Curiel, Tyler J. et al. 2004. “Specific Recruitment of Regulatory T Cells in Ovarian Carcinoma



- Fosters Immune Privilege and Predicts Reduced Survival." *Nature Medicine* 10(9):942–49. Retrieved (<http://www.nature.com/doi/10.1038/nm1093>).
- Curti, Antonio et al. 2011. "Successful Transfer of Alloreactive Haploidentical KIR Ligand-Mismatched Natural Killer Cells after Infusion in Elderly High Risk Acute Myeloid Leukemia Patients." *Blood* 118(12):3273–79.
- Darmon, Alison J., Donald W. Nicholson, and R.Chris Bleackley. 1995. "Activation of the Apoptotic Protease CPP32 by Cytotoxic T-Cell-Derived Granzyme B." *Nature* 377(6548):446–48. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1038/377446a0>).
- Davis, J. E., M. J. Smyth, and J. A. Trapani. 2001. "Granzyme A and B-Deficient Killer Lymphocytes Are Defective in Eliciting DNA Fragmentation but Retain Potent in Vivo Anti-Tumor Capacity." *European journal of immunology* 31(1):39–47.
- Delahaye, N. F. et al. 2011. "Alternatively Spliced NKp30 Isoforms Affect the Prognosis of Gastrointestinal Stromal Tumors." *Nat Med* 17(6):700–707. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21552268>).
- Demetri, George D. 2002. "Identification and Treatment of Chemoresistant Inoperable or Metastatic GIST: Experience with the Selective Tyrosine Kinase Inhibitor Imatinib Mesylate (STI571)." *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 38 Suppl 5:S52-9.
- DeNardo, David G. et al. 2009. "CD4+ T Cells Regulate Pulmonary Metastasis of Mammary Carcinomas by Enhancing Protumor Properties of Macrophages." *Cancer Cell* 16(2):91–102. Retrieved (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1535610809002165>).
- Derre, L. et al. 2006. "Expression and Release of HLA-E by Melanoma Cells and Melanocytes: Potential Impact on the Response of Cytotoxic Effector Cells." *The Journal of Immunology* 177(5):3100–3107. Retrieved (<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.177.5.3100>).
- Derre, Laurent et al. 2006. "Expression and Release of HLA-E by Melanoma Cells and Melanocytes: Potential Impact on the Response of Cytotoxic Effector Cells." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 177(5):3100–3107.

- Diefenbach, A., A. M. Jamieson, S. D. Liu, N. Shastri, and D. H. Raulet. 2000. "Ligands for the Murine NKG2D Receptor: Expression by Tumor Cells and Activation of NK Cells and Macrophages." *Nature immunology* 1(2):119–26.
- Diefenbach, Andreas et al. 2002. "Selective Associations with Signaling Proteins Determine Stimulatory versus Costimulatory Activity of NKG2D." *Nature immunology* 3(12):1142–49.
- Diefenbach, Andreas, Jennifer K. Hsia, Ming-Yu B. Hsiung, and David H. Raulet. 2003. "A Novel Ligand for the NKG2D Receptor Activates NK Cells and Macrophages and Induces Tumor Immunity." *European journal of immunology* 33(2):381–91.
- Dong, Haidong et al. 2002. "Tumor-Associated B7-H1 Promotes T-Cell Apoptosis: A Potential Mechanism of Immune Evasion." *Nature Medicine* (4):793–800. Retrieved (<http://www.nature.com/doi/10.1038/nm730>).
- van Dongen, Minka et al. 2010. "Anti-Inflammatory M2 Type Macrophages Characterize Metastasized and Tyrosine Kinase Inhibitor-Treated Gastrointestinal Stromal Tumors." *International journal of cancer* 127(4):899–909.
- Dunn, Gavin P., Allen T. Bruce, Hiroaki Ikeda, Lloyd J. Old, and Robert D. Schreiber. 2002. "Cancer Immunoediting: From Immunosurveillance to Tumor Escape." *Nature Immunology* 3(11):991–98. Retrieved (<http://www.nature.com/doi/10.1038/ni1102-991>).
- Edge, Stephen B. and Carolyn C. Compton. 2010. "The American Joint Committee on Cancer: The 7th Edition of the AJCC Cancer Staging Manual and the Future of TNM." *Annals of Surgical Oncology* 17(6):1471–74. Retrieved (<http://www.springerlink.com/index/10.1245/s10434-010-0985-4>).
- Edris, Badreddin et al. 2013. "Anti-KIT Monoclonal Antibody Inhibits Imatinib-Resistant Gastrointestinal Stromal Tumor Growth." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(9):3501–6.
- Ehrlich, P. 1909. "Über Den Jetzigen Stand Der Chemotherapie." *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* 42(1):17–47. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1002/cber.19090420105>).

- Elboim, Moran et al. 2010. "Tumor Immunoediting by NKp46." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 184(10):5637–44.
- Elder, G. J., P. Hersey, and P. Branley. 1997. "Remission of Transplanted Melanoma--Clinical Course and Tumour Cell Characterisation." *Clinical transplantation* 11(6):565–568. Retrieved (<http://europepmc.org/abstract/MED/9408685>).
- Elliott, Julie M., Joseph A. Wahle, and Wayne M. Yokoyama. 2010. "MHC Class I-deficient Natural Killer Cells Acquire a Licensed Phenotype after Transfer into an MHC Class I-sufficient Environment." *Journal of Experimental Medicine* 207(10):2073–79. Retrieved (<http://jem.rupress.org/content/207/10/2073>).
- Elsner, Leslie et al. 2007. "The Heat Shock Protein HSP70 Promotes Mouse NK Cell Activity against Tumors That Express Inducible NKG2D Ligands." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 179(8):5523–33.
- Emile, J. F. et al. 2012. "Frequencies of KIT and PDGFRA Mutations in the MolecGIST Prospective Population-Based Study Differ from Those of Advanced GISTs." *Medical Oncology* 29(3):1765–72.
- Esendagli, G. et al. 2008. "Malignant and Non-Malignant Lung Tissue Areas Are Differentially Populated by Natural Killer Cells and Regulatory T Cells in Non-Small Cell Lung Cancer." *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 59(1):32–40.
- Fehniger, T. A. and M. A. Caligiuri. 2001. "Ontogeny and Expansion of Human Natural Killer Cells: Clinical Implications." *Int Rev Immunol* 20(3–4):503–34. Retrieved ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11878513](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11878513)).
- Feldmann, Marc. 2009. "Translating Molecular Insights in Autoimmunity into Effective Therapy." *Annual review of immunology* 27:1–27.
- Fend, Laetitia et al. 2017. "Prognostic Impact of the Expression of NCR1 and NCR3 NK Cell Receptors and PD-L1 on Advanced Non-Small Cell Lung Cancer." *Oncol Immunology* 6(1):e1163456. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1080/2162402X.2016.1163456>).
- Ferlazzo, Guido et al. 2002. "Human Dendritic Cells Activate Resting Natural Killer (NK) Cells

- and Are Recognized via the NKp30 Receptor by Activated NK Cells.” *J. Exp. Med.* 195:343–51. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1084/jem.20011149>).
- Fiegler, Nathalie et al. 2013. “Downregulation of the Activating NKp30 Ligand B7-H6 by HDAC Inhibitors Impairs Tumor Cell Recognition by NK Cells Downregulation of the Activating NKp30 Ligand B7-H6 by HDAC Inhibitors Impairs Tumor Cell Recognition by NK Cells.” 122(5):684–93.
- Fletcher, Jonathan A. and Brian P. Rubin. 2007. “KIT Mutations in GIST.” *Current opinion in genetics & development* 17(1):3–7.
- Forssell, Johan et al. 2007. “High Macrophage Infiltration along the Tumor Front Correlates with Improved Survival in Colon Cancer.” *Clinical Cancer Research* 13(5):1472–79.
- Fregni, Giulia, Aurélie Perier, Marie-Françoise Avril, and Anne Caignard. 2012. “NK Cells Sense Tumors, Course of Disease and Treatments: Consequences for NK-Based Therapies.” *Oncoimmunology* 1(1):38–47. Retrieved (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3376977&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Freud, Aharon G. et al. 2005. “A Human CD34(+) Subset Resides in Lymph Nodes and Differentiates into CD56brightNatural Killer Cells.” *Immunity* 22(3):295–304. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2005.01.013>).
- Freud, Aharon G., Jianhua Yu, and Michael A. Caligiuri. 2014. “Human Natural Killer Cell Development in Secondary Lymphoid Tissues.” *Seminars in immunology* 26(2):132–37. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4010312/>).
- Fridman, W. H. et al. 2014. “The Immune Microenvironment: A Major Player in Human Cancers.” *International Archives of Allergy and Immunology* 164(1):13–26. Retrieved (<http://www.karger.com/DOI/10.1159/000362332>).
- Fuchs, Anja, Marina Cella, Takayuki Kondo, and Marco Colonna. 2005. “Paradoxical Inhibition of Human Natural Interferon-Producing Cells by the Activating Receptor NKp44.” *Blood* 106(6):2076–82.
- Galani, Vasiliki et al. 2016. “IFNs-Signaling Effects on Lung Cancer: An up-to-Date Pathways-

- Specific Review.” *Clinical and Experimental Medicine*. Retrieved (<http://link.springer.com/10.1007/s10238-016-0432-3>).
- Galon, Jérôme et al. 2006. “Type, Density, and Location of Immune Cells Within Human Colorectal Tumors Predict Clinical Outcome.” *Science* 313(5795):1960 LP-1964. Retrieved (<http://science.sciencemag.org/content/313/5795/1960.abstract>).
- Galy, Anne, Marilyn Travis, Dazhi Cen, and Benjamin Chen. 1995. “Human T, B, Natural Killer, and Dendritic Cells Arise from a Common Bone Marrow Progenitor Cell Subset.” *Immunity* 3(4):459–73.
- Gannon, Philippe O. et al. 2009. “Characterization of the Intra-Prostatic Immune Cell Infiltration in Androgen-Deprived Prostate Cancer Patients.” *Journal of Immunological Methods* 348(1–2):9–17. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2009.06.004>).
- Gao, Yunfei et al. 2003. “ $\Gamma\delta$  T Cells Provide an Early Source of Interferon  $\gamma$  in Tumor Immunity.” *The Journal of Experimental Medicine* 198(3):433–42. Retrieved (<http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20030584>).
- Garg, Ankita et al. 2006. “Vimentin Expressed on Mycobacterium Tuberculosis-Infected Human Monocytes Is Involved in Binding to the NKp46 Receptor.” *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 177(9):6192–98.
- Gilfillan, Susan et al. 2008. “DNAM-1 Promotes Activation of Cytotoxic Lymphocytes by Nonprofessional Antigen-Presenting Cells and Tumors.” *The Journal of experimental medicine* 205(13):2965–73.
- Gillard, Geoffrey O. et al. 2011. “Thy1+ NK [Corrected] Cells from Vaccinia Virus-Primed Mice Confer Protection against Vaccinia Virus Challenge in the Absence of Adaptive Lymphocytes.” *PLoS pathogens* 7(8):e1002141.
- Giuliani, Massimo et al. 2008. “Generation of a Novel Regulatory NK Cell Subset from Peripheral Blood CD34+ Progenitors Promoted by Membrane-Bound IL-15.” *PloS one* 3(5):e2241.
- Glasner, A. et al. 2012. “Recognition and Prevention of Tumor Metastasis by the NK Receptor NKp46/NCR1.” *The Journal of Immunology* 188(6):2509–15. Retrieved

(<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1102461>).

Glienke, Wolfgang et al. 2015. "Advantages and Applications of CAR-Expressing Natural Killer Cells." *Frontiers in pharmacology* 6:21.

Gobert, Michael et al. 2009. "Regulatory T Cells Recruited through CCL22/CCR4 Are Selectively Activated in Lymphoid Infiltrates Surrounding Primary Breast Tumors and Lead to an Adverse Clinical Outcome." *Cancer Research* 69(5):2000–2009.

Goldberg, Rimma, Natalie Prescott, Graham M. Lord, Thomas T. MacDonald, and Nick Powell. 2015. "The Unusual Suspects - Innate Lymphoid Cells as Novel Therapeutic Targets in IBD." *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 12(5):271–83. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1038/nrgastro.2015.52>).

Gorelik, E., R. H. Wiltrot, K. Okumura, S. Habu, and R. B. Herberman. 1982. "Role of NK Cells in the Control of Metastatic Spread and Growth of Tumor Cells in Mice." *International journal of cancer* 30(1):107–12.

Grell, M., H. Wajant, G. Zimmermann, and P. Scheurich. 1998. "The Type 1 Receptor (CD120a) Is the High-Affinity Receptor for Soluble Tumor Necrosis Factor." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(2):570–75.

Groh, Veronika, Jennifer Wu, Cassian Yee, and Thomas Spies. 2002a. "Tumour-Derived Soluble MIC Ligands Impair Expression of NKG2D and T-Cell Activation." *Nature* 419(6908):734–38. Retrieved (<http://www.nature.com/doi/10.1038/nature01112>).

Groh, Veronika, Jennifer Wu, Cassian Yee, and Thomas Spies. 2002b. "Tumour-Derived Soluble MIC Ligands Impair Expression of NKG2D and T-Cell Activation." *Nature* 419(6908):734–38.

Gronchi, Alessandro. 2013. "Risk Stratification Models and Mutational Analysis: Keys to Optimising Adjuvant Therapy in Patients with Gastrointestinal Stromal Tumour." *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 49(4):884–92.

Grossenbacher, Steven K., Robert J. Canter, and William J. Murphy. 2016. "Natural Killer Cell Immunotherapy to Target Stem-like Tumor Cells." *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*

- 4(1):19. Retrieved (<http://www.immunotherapyofcancer.org/content/4/1/19>).
- Grzywacz, Bartosz et al. 2011. "Natural Killer–cell Differentiation by Myeloid Progenitors." *Blood* 117(13):3548 LP-3558. Retrieved (<http://www.bloodjournal.org/content/117/13/3548.abstract>).
- Guazzelli, Alice et al. 2017. "Anti-CTLA-4 Therapy for Malignant Mesothelioma." *Immunotherapy* 9(3):273–80.
- Guerra, Nadia et al. 2008. "NKG2D-Deficient Mice Are Defective in Tumor Surveillance in Models of Spontaneous Malignancy." *Immunity* 28(4):571–80.
- Guiguet, Marguerite et al. 2009. "Effect of Immunodeficiency, HIV Viral Load, and Antiretroviral Therapy on the Risk of Individual Malignancies (FHDH-ANRS CO4): A Prospective Cohort Study." *The Lancet Oncology* 10(12):1152–59. Retrieved (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1470204509702827>).
- Guillerey, Camille and Mark J. Smyth. 2016. "NK Cells and Cancer Immunoediting." Pp. 115–45 in *Natural Killer Cells*, edited by E. Vivier, J. Di Santo, and A. Moretta. Cham: Springer International Publishing. Retrieved ([http://dx.doi.org/10.1007/82\\_2015\\_446](http://dx.doi.org/10.1007/82_2015_446)).
- Gunturi, Anasuya, Rance E. Berg, and James Forman. 2004. "The Role of CD94/NKG2 in Innate and Adaptive Immunity." *Immunologic research* 30(1):29–34.
- Guo, Zhang-Yan et al. 2015. "Predictive Value of HLA-G and HLA-E in the Prognosis of Colorectal Cancer Patients." *Cellular immunology* 293(1):10–16.
- Halfteck, G. G. et al. 2009. "Enhanced In Vivo Growth of Lymphoma Tumors in the Absence of the NK-Activating Receptor NKp46/NCR1." *The Journal of Immunology* 182(4):2221–30. Retrieved (<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.0801878>).
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg. 2000. "The Hallmarks of Cancer." *Cell* 100(1):57–70. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10647931>).
- Hanahan, Douglas and Robert A. Weinberg. 2011. "Hallmarks of Cancer: The next Generation." *Cell* 144(5):646–74. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>).
- Harris, David P. et al. 2000. "Reciprocal Regulation of Polarized Cytokine Production by

- Effector B and T Cells." *Nat Immunol* 1(6):475–82. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1038/82717>).
- Hartmann, F. et al. 1997. "Treatment of Refractory Hodgkin's Disease with an Anti-CD16/CD30 Bispecific Antibody." *Blood* 89(6):2042–47.
- Hayashi, Tomonori et al. 2006. "Identification of the NKG2D Haplotypes Associated with Natural Cytotoxic Activity of Peripheral Blood Lymphocytes and Cancer Immunosurveillance." *Cancer research* 66(1):563–70.
- He, Songbing et al. 2011. "Distribution and Clinical Significance of Th17 Cells in the Tumor Microenvironment and Peripheral Blood of Pancreatic Cancer Patients." *International journal of molecular sciences* 12(11):7424–37.
- Heinrich, Michael C., Charles D. Blanke, Brian J. Druker, and Christopher L. Corless. 2002. "Inhibition of KIT Tyrosine Kinase Activity: A Novel Molecular Approach to the Treatment of KIT-Positive Malignancies." *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 20(6):1692–1703.
- Hershkovitz, Oren et al. 2007. "Characterization of the Recognition of Tumor Cells by the Natural Cytotoxicity." 7426–36.
- Höglund, P. et al. 1991. "Recognition of Beta 2-Microglobulin-Negative (Beta 2m-) T-Cell Blasts by Natural Killer Cells from Normal but Not from Beta 2m- Mice: Nonresponsiveness Controlled by Beta 2m- Bone Marrow in Chimeric Mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88(22):10332–36. Retrieved (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=52922&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Höglund, Petter and Petter Brodin. 2010. "Current Perspectives of Natural Killer Cell Education by MHC Class I Molecules." *Nature Reviews Immunology* 10(10):724–34. Retrieved (<http://www.nature.com/doi/10.1038/nri2835>).
- Hoover, Robert and JosephF Fraumeni. 1973. "RISK OF CANCER IN RENAL-TRANSPLANT RECIPIENTS." *The Lancet* 302(7820):55–57. Retrieved (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014067367393256X>).



- van Horssen, Remco, Timo L. M. Ten Hagen, and Alexander M. M. Eggermont. 2006. "TNF-Alpha in Cancer Treatment: Molecular Insights, Antitumor Effects, and Clinical Utility." *The oncologist* 11(4):397–408.
- Hotta, Chie et al. 2000. "Impaired Expression of MHC Class I Molecules on Mouse Testicular Germ Cells Is Mainly Caused by the Post-Transcriptional Mechanism." *Immunogenetics* 51(8–9):624–31.
- Hu, Wen-Ting et al. 2015. "Decidual Stromal Cell-Derived IL-33 Contributes to Th2 Bias and Inhibits Decidual NK Cell Cytotoxicity through NF-κB Signaling in Human Early Pregnancy." *Journal of Reproductive Immunology* 109:52–65. Retrieved (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165037815000224>).
- Hu, Xiaoyu, Soumya D. Chakravarty, and Lionel B. Ivashkiv. 2008. "Regulation of Interferon and Toll-like Receptor Signaling during Macrophage Activation by Opposing Feedforward and Feedback Inhibition Mechanisms." *Immunological reviews* 226:41–56.
- Hudspeth, Kelly, Bruno Silva-Santos, and Domenico Mavilio. 2013. "Natural Cytotoxicity Receptors: Broader Expression Patterns and Functions in Innate and Adaptive Immune Cells." *Frontiers in immunology* 4:69.
- Iannello, Alexandre, Thornton W. Thompson, Michele Ardolino, Scott W. Lowe, and David H. Raulet. 2013. "p53-Dependent Chemokine Production by Senescent Tumor Cells Supports NKG2D-Dependent Tumor Elimination by Natural Killer Cells." *The Journal of experimental medicine* 210(10):2057–69.
- Iguchi-Manaka, Akiko et al. 2008. "Accelerated Tumor Growth in Mice Deficient in DNAM-1 Receptor." *The Journal of experimental medicine* 205(13):2959–64.
- Ikeda, Hiroaki, Lloyd J. Old, and Robert D. Schreiber. 2002. "The Roles of IFN Gamma in Protection against Tumor Development and Cancer Immunoediting." *Cytokine & growth factor reviews* 13(2):95–109.
- Imai, K., S. Matsuyama, S. Miyake, K. Suga, and K. Nakachi. 2000. "Natural Cytotoxic Activity of Peripheral-Blood Lymphocytes and Cancer Incidence: An 11-Year Follow-up Study of a General Population." *Lancet (London, England)* 356(9244):1795–99.

- INCa. 2016. "Les Cancers En France 2016." Retrieved ([http://www.e-cancer.fr/ressources/cancers\\_en\\_france/#page=1](http://www.e-cancer.fr/ressources/cancers_en_france/#page=1)).
- Ishigami, S. et al. 2000. "Prognostic Value of Intratumoral Natural Killer Cells in Gastric Carcinoma." *Cancer* 88(3):577–83.
- Jabrane-Ferrat, Nabila and Johan Siewiera. 2014. "The up Side of Decidual Natural Killer Cells: New Developments in Immunology of Pregnancy." *Immunology* 141(4):490–97. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1111/imm.12218>).
- Jamieson, Amanda M. et al. 2002. "The Role of the NKG2D Immunoreceptor in Immune Cell Activation and Natural Killing." *Immunity* 17(1):19–29.
- Joncker, Nathalie T., Nadine C. Fernandez, Emmanuel Treiner, Eric Vivier, and David H. Raulet. 2009. "NK Cell Responsiveness Is Tuned Commensurate with the Number of Inhibitory Receptors for Self-MHC Class I: The Rheostat Model." *The Journal of Immunology* 182(8):4572–80. Retrieved (<http://www.jimmunol.org/content/182/8/4572>).
- Joncker, Nathalie T., Nataliya Shifrin, Frédéric Delebecque, and David H. Raulet. 2010. "Mature Natural Killer Cells Reset Their Responsiveness When Exposed to an Altered MHC Environment." *Journal of Experimental Medicine* 207(10):2065–72. Retrieved (<http://jem.rupress.org/content/207/10/2065>).
- Joyce, Johanna A. and Jeffrey W. Pollard. 2009. "Microenvironmental Regulation of Metastasis." *Nat Rev Cancer* 9(4):239–52. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1038/nrc2618>).
- Juelke, Kerstin et al. 2010. "CD62L Expression Identifies a Unique Subset of Polyfunctional CD56<sup>+</sup> NK Cells." *Blood* 116(8):1299 LP-1307. Retrieved (<http://www.bloodjournal.org/content/116/8/1299.abstract>).
- Kalliolias, George D. and Lionel B. Ivashkiv. 2015. "TNF Biology, Pathogenic Mechanisms and Emerging Therapeutic Strategies." *Nature Reviews Rheumatology* 12(1):49–62. Retrieved (<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrrheum.2015.169>).
- Karlhofer, F. M., R. K. Ribaldo, and W. M. Yokoyama. 1992. "MHC Class I Alloantigen

- Specificity of Ly-49+ IL-2-Activated Natural Killer Cells." *Nature* 358(6381):66–70.
- Kärre, Klas, Hans Gustaf Ljunggren, Gerald Piontek, and Rolf Kiessling. 1986. "Selective Rejection of H-2-Deficient Lymphoma Variants Suggests Alternative Immune Defence Strategy. 1986." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 174(11):6566–69.
- Kashii, Yoshiro, Roberto Giorda, Ronald B. Herberman, Theresa L. Whiteside, and Nikola L. Vujanovic. 1999. "Constitutive Expression and Role of the TNF Family Ligands in Apoptotic Killing of Tumor Cells by Human NK Cells." *The Journal of Immunology* 163(10):5358 LP-5366. Retrieved (<http://www.jimmunol.org/content/163/10/5358.abstract>).
- Katz, S. C. et al. 2013. "Anti-KIT Designer T Cells for the Treatment of Gastrointestinal Stromal Tumor." *J Transl Med* 11(1):46. Retrieved (Journal of Translational Medicine).
- Kawai, Osamu et al. 2008. "Predominant Infiltration of Macrophages and CD8+ T Cells in Cancer Nests Is a Significant Predictor of Survival in Stage IV Nonsmall Cell Lung Cancer." *Cancer* 113(6):1387–95.
- Kellner, C. et al. 2012. "Fusion Proteins between Ligands for NKG2D and CD20-Directed Single-Chain Variable Fragments Sensitize Lymphoma Cells for Natural Killer Cell-Mediated Lysis and Enhance Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity." *Leukemia* 26(4):830–34.
- Kiessling, R., Eva Klein, H. Pross, and H. Wigzell. 1975. "„Natural" □ Killer Cells in the Mouse. II. Cytotoxic Cells with Specificity for Mouse Moloney Leukemia Cells. Characteristics of the Killer Cell." *European Journal of Immunology* 5(2):117–21. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1002/eji.1830050209>).
- Kiessling, R., Eva Klein, and H. Wigzell. 1975. "„Natural" □ Killer Cells in the Mouse. I. Cytotoxic Cells with Specificity for Mouse Moloney Leukemia Cells. Specificity and Distribution according to Genotype." *European Journal of Immunology* 5(2):112–17. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1002/eji.1830050208>).
- Kim, D. W. et al. 2008. "High Tumour Islet Macrophage Infiltration Correlates with Improved Patient Survival but Not with EGFR Mutations, Gene Copy Number or Protein Expression in Resected Non-Small Cell Lung Cancer." *British journal of cancer*

98(6):1118–24.

Retrieved

(<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2275476&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).

Kim, Peter S. et al. 2016. “IL-15 superagonist/IL-15 $\alpha$ Sushi-Fc Fusion Complex (IL-15SA/IL-15 $\alpha$ Su-Fc; ALT-803) Markedly Enhances Specific Subpopulations of NK and Memory CD8<sup>+</sup> T Cells, and Mediates Potent Anti-Tumor Activity against Murine Breast and Colon Carcinomas.” *Oncotarget* 7(13):16130–45.

Kim, Sungjin et al. 2005. “Licensing of Natural Killer Cells by Host Major Histocompatibility Complex Class I Molecules.” *Nature* 436(7051):709–13. Retrieved (<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature03847>).

Kinlen, Leo J. 1985. “Incidence of Cancer in Rheumatoid Arthritis and Other Disorders after Immunosuppressive Treatment.” *The American Journal of Medicine* 78(1):44–49. Retrieved (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0002934385902451>).

Klingemann, Hans. 2014. “Are Natural Killer Cells Superior CAR Drivers?” *Oncoimmunology* 3:e28147.

Klingemann, Hans. 2015. “Challenges of Cancer Therapy with Natural Killer Cells.” *Cytotherapy* 17(3):245–49.

Klose, Christoph S. N. et al. 2013. “A T-Bet Gradient Controls the Fate and Function of CCR6<sup>+</sup>ROR $\gamma$ mat<sup>+</sup> Innate Lymphoid Cells.” *Nature* 494(7436):261–65.

Klose, Christoph S. N. et al. 2017. “Differentiation of Type 1 ILCs from a Common Progenitor to All Helper-like Innate Lymphoid Cell Lineages.” *Cell* 157(2):340–56. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.030>).

Knox, James J., Gabriela L. Cosma, Michael R. Betts, and Laura M. McLane. 2014. “Characterization of T-Bet and Eomes in Peripheral Human Immune Cells.” *Frontiers in immunology* 5:217.

Kobayashi, N. 1985. “Malignant Neoplasms in Registered Cases of Primary Immunodeficiency Syndrome.” *Japanese journal of clinical oncology* 15 Suppl 1:307–12. Retrieved (<http://europepmc.org/abstract/MED/4009992>).

- Kochan, Grazyna, David Escors, Karine Breckpot, and David Guerrero-Setas. 2013. "Role of Non-Classical MHC Class I Molecules in Cancer Immunosuppression." *Oncoimmunology* 2(11):e26491.
- Koebel, Catherine M. et al. 2007. "Adaptive Immunity Maintains Occult Cancer in an Equilibrium State." *Nature* 450(7171):903–7. Retrieved (<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature06309>).
- Kohrt, Holbrook E. et al. 2011. "CD137 Stimulation Enhances the Antilymphoma Activity of Anti-CD20 Antibodies." *Blood* 117(8):2423–32.
- Kohrt, Holbrook E. et al. 2014. "Anti-KIR Antibody Enhancement of Anti-Lymphoma Activity of Natural Killer Cells as Monotherapy and in Combination with Anti-CD20 Antibodies." *Blood* 123(5):678–86.
- Komita, Hideo et al. 2015. "Expression of Immune Checkpoint Molecules of T Cell Immunoglobulin and Mucin Protein 3/galectin-9 for NK Cell Suppression in Human Gastrointestinal Stromal Tumors." *Oncology reports* 34(4):2099–2105.
- Kondo, Motonari, Irving L. Weissman, and Koichi Akashi. 1997. "Identification of Clonogenic Common Lymphoid Progenitors in Mouse Bone Marrow." *Cell* 91(5):661–72. Retrieved ([http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80453-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80453-5)).
- Korde, Neha et al. 2014. "A Phase II Trial of Pan-KIR2D Blockade with IPH2101 in Smoldering Multiple Myeloma." *Haematologica* 99(6):e81-3.
- Krebs, Philippe et al. 2009. "NK-Cell-Mediated Killing of Target Cells Triggers Robust Antigen-Specific T-Cell-Mediated and Humoral Responses." *Blood* 113(26):6593–6602.
- Kristensen, V. N. et al. 2012. "Integrated Molecular Profiles of Invasive Breast Tumors and Ductal Carcinoma in Situ (DCIS) Reveal Differential Vascular and Interleukin Signaling." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(8):2802–7. Retrieved (<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1108781108>).
- Kruse, Philip H., Jessica Matta, Sophie Ugolini, and Eric Vivier. 2014. "Natural Cytotoxicity Receptors and Their Ligands." *Immunology and Cell Biology* 92(3):221–29. Retrieved (<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/icb.2013.98>).

- Kryczek, Ilona, Mousumi Banerjee, et al. 2009. "Phenotype, Distribution, Generation, and Functional and Clinical Relevance of Th17 Cells in the Human Tumor Environments." *Blood* 114(6):1141–49.
- Kryczek, Ilona, Shuang Wei, Wojciech Szeliga, Linhua Vatan, and Weiping Zou. 2009. "Endogenous IL-17 Contributes to Reduced Tumor Growth and Metastasis." *Blood* 114(2):357–59.
- Krzewski, Konrad and John E. Coligan. 2012. "Human NK Cell Lytic Granules and Regulation of Their Exocytosis." *Frontiers in Immunology* 3(NOV):1–16.
- Kuijpers, Taco W. et al. 2008. "Human NK Cells Can Control CMV Infection in the Absence of T Cells." *Blood* 112(3):914–15. Retrieved (<http://www.bloodjournal.org/content/112/3/914>).
- Lanier, L. L., R. Testi, J. Bindl, and J. H. Phillips. 1989. "Identity of Leu-19 (CD56) Leukocyte Differentiation Antigen and Neural Cell Adhesion Molecule." *The Journal of Experimental Medicine* 169(6):2233 LP-2238. Retrieved (<http://jem.rupress.org/content/169/6/2233.abstract>).
- Lasota, Jerzy et al. 2008. "Clinicopathologic Profile of Gastrointestinal Stromal Tumors (GISTs) with Primary KIT Exon 13 or Exon 17 Mutations: A Multicenter Study on 54 Cases." *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 21(4):476–84.
- Lasota, Jerzy and Markku Miettinen. 2006. "KIT and PDGFRA Mutations in Gastrointestinal Stromal Tumors (GISTs)." *Seminars in diagnostic pathology* 23(2):91–102.
- Lee, Ju Han, Younghye Kim, Jung Woo Choi, and Young Sik Kim. 2013. "Correlation of Imatinib Resistance with the Mutational Status of KIT and PDGFRA Genes in Gastrointestinal Stromal Tumors: A Meta-Analysis." *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases* 22(4):413–18.
- Li, Hai et al. 2011. "Pharmacological Activation of p53 Triggers Anticancer Innate Immune Response through Induction of ULBP2." *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 10(19):3346–58.
- Li, Yan and James P. Di Santo. 2016. "Probing Human NK Cell Biology Using Human Immune

- System (HIS) Mice." *Current topics in microbiology and immunology* 395:191–208.
- Liao, N. S., M. Bix, M. Zijlstra, R. Jaenisch, and D. Raulet. 1991. "MHC Class I Deficiency: Susceptibility to Natural Killer (NK) Cells and Impaired NK Activity." *Science* 253(5016):199–202. Retrieved (<http://science.sciencemag.org/content/253/5016/199>).
- Lin, Yong et al. 2004. "Tumor Necrosis Factor-Induced Nonapoptotic Cell Death Requires Receptor-Interacting Protein-Mediated Cellular Reactive Oxygen Species Accumulation." *The Journal of biological chemistry* 279(11):10822–28.
- Linnekin, D. 1999. "Early Signaling Pathways Activated by c-Kit in Hematopoietic Cells." *The international journal of biochemistry & cell biology* 31(10):1053–74.
- Liu, J. et al. 1998. "TNF Is a Potent Anti-Inflammatory Cytokine in Autoimmune-Mediated Demyelination." *Nature medicine* 4(1):78–83.
- Ljunggren, H. G. and K. Karre. 1985. "Host Resistance Directed Selectively against H-2-Deficient Lymphoma Variants. Analysis of the Mechanism." *The Journal of experimental medicine* 162(6):1745–59.
- Ljunggren, H. G., K. Sturmhofel, E. Wolpert, G. J. Hammerling, and K. Karre. 1990. "Transfection of Beta 2-Microglobulin Restores IFN-Mediated Protection from Natural Killer Cell Lysis in YAC-1 Lymphoma Variants." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 145(1):380–86.
- Lopez-Vergès, Sandra et al. 2010. "CD57 Defines a Functionally Distinct Population of Mature NK Cells in the Human CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> NK-Cell Subset." *Blood* 116(19):3865 LP-3874. Retrieved (<http://www.bloodjournal.org/content/116/19/3865.abstract>).
- Magri, Giuliana et al. 2011. "NKp46 and DNAM-1 NK-Cell Receptors Drive the Response to Human Cytomegalovirus-Infected Myeloid Dendritic Cells Overcoming Viral Immune Evasion Strategies." *Blood* 117(3):848 LP-856. Retrieved (<http://www.bloodjournal.org/content/117/3/848.abstract>).
- Mahmoud, Sahar M. A. et al. 2011. "Tumor-Infiltrating CD8+ Lymphocytes Predict Clinical Outcome in Breast Cancer." *Journal of Clinical Oncology* 29(15):1949–55. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2010.30.5037>).

- Maier, Armin, Anne-Lise Peille, Vincent Vuaroqueaux, and Michael Lahn. 2015. "Anti-Tumor Activity of the TGF-Beta Receptor Kinase Inhibitor Galunisertib (LY2157299 Monohydrate) in Patient-Derived Tumor Xenografts." *Cellular oncology (Dordrecht)* 38(2):131–44.
- Mamessier, Emilie et al. 2011. "Human Breast Cancer Cells Enhance Self Tolerance by Promoting Evasion from NK Cell Antitumor Immunity." *The Journal of clinical investigation* 121(9):3609–22.
- Mandelboim, O. et al. 2001. "Recognition of Haemagglutinins on Virus-Infected Cells by NKp46 Activates Lysis by Human NK Cells." *Nature* 409(6823):1055–60.
- Mantovani, Alberto, Tiziana Schioppa, Chiara Porta, Paola Allavena, and Antonio Sica. 2006. "Role of Tumor-Associated Macrophages in Tumor Progression and Invasion." *Cancer and Metastasis Reviews* 25(3):315–22.
- Mantovani, Stefania et al. 2015. "NKp30 Isoforms in Patients with Chronic Hepatitis C Virus Infection." *Immunology* 146(2):234–42.
- Marcais, Antoine et al. 2013. "Regulation of Mouse NK Cell Development and Function by Cytokines." *Frontiers in immunology* 4:450.
- De Maria, Andrea et al. 2003. "The Impaired NK Cell Cytolytic Function in Viremic HIV-1 Infection Is Associated with a Reduced Surface Expression of Natural Cytotoxicity Receptors (NKp46, NKp30 and NKp44)." *European Journal of Immunology* 33(9):2410–18. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1002/eji.200324141>).
- Marie-Cardine, Anne et al. 2014. "IPH4102, a Humanized KIR3DL2 Antibody with Potent Activity against Cutaneous T-Cell Lymphoma." *Cancer Research* 74(21):6060–70.
- Marino, M. W. et al. 1997. "Characterization of Tumor Necrosis Factor-Deficient Mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(15):8093–98.
- Martin-Fontecha, Alfonso et al. 2004. "Induced Recruitment of NK Cells to Lymph Nodes Provides IFN-[Gamma] for TH1 Priming." *Nat Immunol* 5(12):1260–65. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1038/ni1138>).



- Martin, Maureen P. et al. 2002. "Epistatic Interaction between KIR3DS1 and HLA-B Delays the Progression to AIDS." *Nature genetics* 31(4):429–34.
- Marvel, Douglas and Dmitry I. Gabilovich. 2015. "Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment : Expect the Unexpected." *The Journal Clinical Investigation* 125(9):3356–64.
- Matta, Jessica et al. 2013. "Induction of B7-H6 , a Ligand for the Natural Killer Cell – Activating Receptor NKp30 , in in Fl Ammatory Conditions." 122(3):394–405.
- Mazur, M. T. and H. B. Clark. 1983. "Gastric Stromal Tumors. Reappraisal of Histogenesis." *The American journal of surgical pathology* 7(6):507–19.
- McGilvray, Roger W. et al. 2009. "NKG2D Ligand Expression in Human Colorectal Cancer Reveals Associations with Prognosis and Evidence for Immunoediting." *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 15(22):6993–7002.
- McWilliams, Emily M. et al. 2016. "Therapeutic CD94/NKG2A Blockade Improves Natural Killer Cell Dysfunction in Chronic Lymphocytic Leukemia." *Oncoimmunology* 5(10):e1226720.
- van der Meer, J. W. M., I. P. van Munster, F. M. Nagengast, R. S. Weening, and P. T. A. Schellekens. 1993. "Colorectal Cancer in Patients with X-Linked Agammaglobulinaemia." *The Lancet* 341(8858):1439–40. Retrieved (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0140673693908831>).
- Menard, C. et al. 2009. "Natural Killer Cell IFN-Gamma Levels Predict Long-Term Survival with Imatinib Mesylate Therapy in Gastrointestinal Stromal Tumor-Bearing Patients." *Cancer Res* 69(8):3563–69. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19351841%5Cnhttp://cancerres.aacrjournals.org/content/69/8/3563.full.pdf>).
- Meresse, Bertrand et al. 2006. "Reprogramming of CTLs into Natural Killer-like Cells in Celiac Disease." *The Journal of experimental medicine* 203(5):1343–55.
- Messaoudene, Meriem et al. 2014. "Mature Cytotoxic CD56bright/CD16+ Natural Killer Cells

- Can Infiltrate Lymph Nodes Adjacent to Metastatic Melanoma.” *Cancer Research* 74(1):81 LP-92. Retrieved (<http://cancerres.aacrjournals.org/content/74/1/81.abstract>).
- Messaoudene, Meriem et al. 2015. “Characterization of the Microenvironment in Positive and Negative Sentinel Lymph Nodes from Melanoma Patients.” *PLoS ONE* 10(7):1–16.
- Messaoudene, Meriem et al. 2016. “NKp30 Isoforms and NKp46 Transcripts in Metastatic Melanoma Patients : Unique NKp30 Pattern in Rare Melanoma Patients with Favorable Evolution.” 5(12).
- Miettinen, Markku and Jerzy Lasota. 2006. “Gastrointestinal Stromal Tumors: Pathology and Prognosis at Different Sites.” *Seminars in diagnostic pathology* 23(2):70–83.
- Mittal, Deepak et al. 2014. “Antimetastatic Effects of Blocking PD-1 and the Adenosine A2A Receptor.” *Cancer research* 74(14):3652–58.
- Mjosberg, Jenny M. et al. 2011. “Human IL-25- and IL-33-Responsive Type 2 Innate Lymphoid Cells Are Defined by Expression of CCR4 and CD161.” *Nat Immunol* 12(11):1055–62. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1038/ni.2104>).
- De Monte, Lucia et al. 2011. “Intratumor T Helper Type 2 Cell Infiltrate Correlates with Cancer-Associated Fibroblast Thymic Stromal Lymphopoietin Production and Reduced Survival in Pancreatic Cancer.” *The Journal of Experimental Medicine* 208(3):469 LP-478. Retrieved (<http://jem.rupress.org/content/208/3/469.abstract>).
- Monticelli, Laurel A. et al. 2011. “Innate Lymphoid Cells Promote Lung Tissue Homeostasis Following Acute Influenza Virus Infection.” *Nature immunology* 12(11):1045–54. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3320042/>).
- Moretta, A. et al. 1996. “Receptors for HLA Class-I Molecules in Human Natural Killer Cells.” *Annual review of immunology* 14:619–48.
- Moretta, Alessandro et al. 2001. “Activating Receptors and Coreceptors Involved in Human Natural Killer Cell-Mediated Cytolysis.” *Annual review of immunology* 19:197–223.
- Mougiakakos, Dimitrios, Aniruddha Choudhury, Alvaro Lladser, Rolf Kiessling, and C.Christian Johansson. 2010. “Chapter 3 - Regulatory T Cells in Cancer.” Pp. 57–117 in, vol. Volume 107, edited by G. F. V. W. and G. K. B. T.-A. in C. Research. Academic Press. Retrieved

(<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065230X1007003X>).

- Munn, David H. 2006. "Indoleamine 2, 3-Dioxygenase, Tumor-Induced Tolerance and Counter-Regulation." *Current opinion in immunology* 18(2):220–25.
- Munz, Christian et al. 2005. "Mature Myeloid Dendritic Cell Subsets Have Distinct Roles for Activation and Viability of Circulating Human Natural Killer Cells." *Blood* 105(1):266–73.
- Naito, Yoshitaka et al. 1998. "CD8 + T Cells Infiltrated within Cancer Cell Nests as a Prognostic Factor in Human Colorectal Cancer Advances in Brief CD8 + T Cells Infiltrated within Cancer Cell Nests as a Prognostic Factor in Human Colorectal Cancer." 3491–94.
- Narni-mancinelli, Emilie et al. 2017. "Europe PMC Funders Group Complement Factor P Is a Ligand for the Natural Killer Cell – Activating Receptor NKp46." 2(62).
- Naryzhny, Stanislav N. and Hoyun Lee. 2007. "Characterization of Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) Isoforms in Normal and Cancer Cells: There Is No Cancer-Associated Form of PCNA." *FEBS Letters* 581(25):4917–20. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2007.09.022>).
- Navarro, F. et al. 1999. "The ILT2(LIR1) and CD94/NKG2A NK Cell Receptors Respectively Recognize HLA-G1 and HLA-E Molecules Co-Expressed on Target Cells." *European journal of immunology* 29(1):277–83.
- Nel, Isabelle et al. 2016. "Accumulation of Intrahepatic TNF- $\alpha$ -Producing NKp44+ NK Cells Correlates With Liver Fibrosis and Viral Load in Chronic HCV Infection." *Medicine* 95(19):e3678. Retrieved (<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00005792-201605100-00083>).
- Neville, M. J. and R. D. Campbell. 1999. "A New Member of the Ig Superfamily and a V-ATPase G Subunit Are among the Predicted Products of Novel Genes close to the TNF Locus in the Human MHC." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 162(8):4745–54.
- Nguyen, Long V, Robert Vanner, Peter Dirks, and Connie J. Eaves. 2012. "Cancer Stem Cells: An Evolving Concept." *Nat Rev Cancer* 12(2):133–43. Retrieved

(<http://dx.doi.org/10.1038/nrc3184>).

- Nguyen, S. et al. 2009. "HLA-E Upregulation on IFN-Gamma-Activated AML Blasts Impairs CD94/NKG2A-Dependent NK Cytolysis after Haplo-Mismatched Hematopoietic SCT." *Bone marrow transplantation* 43(9):693–99.
- Ni, Jing, Matthias Miller, Ana Stojanovic, Natalio Garbi, and Adelheid Cerwenka. 2012. "Sustained Effector Function of IL-12/15/18-Preactivated NK Cells against Established Tumors." *The Journal of experimental medicine* 209(13):2351–65.
- Nilsson, Bengt et al. 2005. "Gastrointestinal Stromal Tumors: The Incidence, Prevalence, Clinical Course, and Prognostication in the Preimatinib Mesylate Era--a Population-Based Study in Western Sweden." *Cancer* 103(4):821–29.
- Nirschl, Christopher J. et al. 2017. "IFN $\gamma$ -Dependent Tissue-Immune Homeostasis Is Co-Opted in the Tumor Microenvironment IFN $\gamma$ -Dependent Tissue-Immune Homeostasis Is Co-Opted in the Tumor Microenvironment." *Cell* 170(5):127–141.e15. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2017.06.016>).
- Nocturne, Gaetane et al. 2017. "Impact of Anti-TNF Therapy on {NK} Cells Function and on Immunosurveillance against B-Cell Lymphomas." *Journal of Autoimmunity* 80:56–64. Retrieved (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896841116304097>).
- Noy, Roy and Jeffrey W. Pollard. 2014. "Tumor-Associated Macrophages: From Mechanisms to Therapy." *Immunity* 41(1):49–61. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.010>).
- Nüchel, H. et al. 2010. "The Prognostic Significance of Soluble NKG2D Ligands in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia." *Leukemia* 24(6):1152–59.
- O'Sullivan, Timothy et al. 2012. "Cancer Immunoediting by the Innate Immune System in the Absence of Adaptive Immunity." *The Journal of Experimental Medicine* 209(10):1869–82. Retrieved (<http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20112738>).
- Ondondo, Beatrice, Emma Jones, Andrew Godkin, and Awen Gallimore. 2013. "Home Sweet Home: The Tumor Microenvironment as a Haven for Regulatory T Cells." *Frontiers in Immunology* 4(JUL):1–9.

- van Oosterom, A. T. et al. 2001. "Safety and Efficacy of Imatinib (STI571) in Metastatic Gastrointestinal Stromal Tumours: A Phase I Study." *Lancet (London, England)* 358(9291):1421–23.
- Oppenheim, David E. et al. 2005. "Sustained Localized Expression of Ligand for the Activating NKG2D Receptor Impairs Natural Cytotoxicity in Vivo and Reduces Tumor Immunosurveillance." *Nature immunology* 6(9):928–37.
- Orr, Mark T. and Lewis L. Lanier. 2010. "Natural Killer Cell Education and Tolerance." *Cell* 142(6):847–56. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.08.031>).
- Ostrand-Rosenberg, S. and P. Sinha. 2009. "Myeloid-Derived Suppressor Cells: Linking Inflammation and Cancer." *The Journal of Immunology* 182(8):4499–4506. Retrieved (<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.0802740>).
- Pagès, F. et al. 2010. "Immune Infiltration in Human Tumors: A Prognostic Factor That Should Not Be Ignored." *Oncogene* 29(8):1093–1102. Retrieved (<http://www.nature.com/doi/10.1038/onc.2009.416>).
- Pai, Rish K., David Askew, W. Henry Boom, and Clifford V Harding. 2002. "Regulation of Class II MHC Expression in APCs: Roles of Types I, III, and IV Class II Transactivator." *The Journal of Immunology* 169(3):1326–33. Retrieved (<http://www.jimmunol.org/content/169/3/1326>).
- Pan, Shi et al. 2002. "Etk/Bmx as a Tumor Necrosis Factor Receptor Type 2-Specific Kinase: Role in Endothelial Cell Migration and Angiogenesis." *Molecular and cellular biology* 22(21):7512–23.
- Pappworth, Isabel Y., Eddie C. Wang, and Martin Rowe. 2007. "The Switch from Latent to Productive Infection in Epstein-Barr Virus-Infected B Cells Is Associated with Sensitization to NK Cell Killing." *Journal of virology* 81(2):474–82.
- Park, Il-Kyoo, Rossana Trotta, Jianhua Yu, and Michael A. Caligiuri. 2013. "Axl/Gas6 Pathway Positively Regulates FLT3 Activation in Human Natural Killer Cell Development." *European Journal of Immunology* 43(10):2750–55. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1002/eji.201243116>).

- Parkhurst, Maria R., John P. Riley, Mark E. Dudley, and Steven A. Rosenberg. 2011. "Adoptive Transfer of Autologous Natural Killer Cells Leads to High Levels of Circulating Natural Killer Cells but Does Not Mediate Tumor Regression." *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 17(19):6287–97.
- Parsons, Matthew S. et al. 2013. "Anti-HIV Antibody–Dependent Activation of NK Cells Impairs Nkp46 Expression." *The Journal of Immunology* 192(1):308 LP-315. Retrieved (<http://www.jimmunol.org/content/192/1/308.abstract>).
- Paschen, Annette et al. 2009. "Differential Clinical Significance of Individual NKG2D Ligands in Melanoma: Soluble ULBP2 as an Indicator of Poor Prognosis Superior to S100B." *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 15(16):5208–15.
- Pasparakis, M., L. Alexopoulou, V. Episkopou, and G. Kollias. 1996. "Immune and Inflammatory Responses in TNF Alpha-Deficient Mice: A Critical Requirement for TNF Alpha in the Formation of Primary B Cell Follicles, Follicular Dendritic Cell Networks and Germinal Centers, and in the Maturation of the Humoral Immune Response." *The Journal of experimental medicine* 184(4):1397–1411.
- Pende, D. et al. 2002. "Major Histocompatibility Complex Class I-Related Chain A and UL16-Binding Protein Expression on Tumor Cell Lines of Different Histotypes: Analysis of Tumor Susceptibility to NKG2D-Dependent Natural Killer Cell Cytotoxicity." *Cancer Research* 62(21):6178–86. Retrieved (<http://cancerres.aacrjournals.org/content/62/21/6178.full.pdf>).
- Perez, Daniel et al. 2011. "Protein Expression of Cancer Testis Antigens Predicts Tumor Recurrence and Treatment Response to Imatinib in Gastrointestinal Stromal Tumors." *International journal of cancer* 128(12):2947–52.
- Perez, Daniel R. et al. 2013. "Blood Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio Is Prognostic in Gastrointestinal Stromal Tumor." *Annals of surgical oncology* 20(2):593–99.
- Perez, Sonia A. et al. 2003. "A Novel Myeloid-like NK Cell Progenitor in Human Umbilical Cord Blood." *Blood* 101(9):3444 LP-3450. Retrieved (<http://www.bloodjournal.org/content/101/9/3444.abstract>).

- Perkins, Neil D. 2007. "Integrating Cell-Signalling Pathways with NF-kappaB and IKK Function." *Nature reviews. Molecular cell biology* 8(1):49–62.
- Perussia, B. and J. V Ravetch. 1991. "Fc Gamma RIII (CD16) on Human Macrophages Is a Functional Product of the Fc Gamma RIII-2 Gene." *European journal of immunology* 21(2):425–29.
- Pesce, Silvia et al. 2015. "B7-H6-Mediated Downregulation of NKp30 in NK Cells Contributes to Ovarian Carcinoma Immune Escape." (April):1–13.
- Pessino, A. et al. 1998. "Molecular Cloning of NKp46: A Novel Member of the Immunoglobulin Superfamily Involved in Triggering of Natural Cytotoxicity." *The Journal of experimental medicine* 188(5):953–60.
- Petitdemange, Caroline et al. 2011. "Unconventional Repertoire Profile Is Imprinted during Acute Chikungunya Infection for Natural Killer Cells Polarization toward Cytotoxicity." *PLoS pathogens* 7(9):e1002268.
- Philo, J. S. et al. 1996. "Human Stem Cell Factor Dimer Forms a Complex with Two Molecules of the Extracellular Domain of Its Receptor, Kit." *The Journal of biological chemistry* 271(12):6895–6902.
- Pidhorecky, I., R. T. Cheney, W. G. Kraybill, and J. F. Gibbs. 2000. "Gastrointestinal Stromal Tumors: Current Diagnosis, Biologic Behavior, and Management." *Annals of surgical oncology* 7(9):705–12.
- Pierie, J. P. et al. 2001. "The Effect of Surgery and Grade on Outcome of Gastrointestinal Stromal Tumors." *Archives of surgery (Chicago, Ill. : 1960)* 136(4):383–89.
- Platonova, Sophia et al. 2011. "Profound Coordinated Alterations of Intratumoral NK Cell Phenotype and Function in Lung Carcinoma." *Cancer Research* 71(16):5412 LP-5422. Retrieved (<http://cancerres.aacrjournals.org/content/71/16/5412.abstract>).
- Pogge von Strandmann, Elke et al. 2007. "Human Leukocyte Antigen-B-Associated Transcript 3 Is Released from Tumor Cells and Engages the NKp30 Receptor on Natural Killer Cells." *Immunity* 27(6):965–74. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2007.10.010>).

- Porrata, Luis F. et al. 2008. "Early Lymphocyte Recovery Predicts Superior Survival after Autologous Stem Cell Transplantation in Non-Hodgkin Lymphoma: A Prospective Study." *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 14(7):807–16.
- Porrata, Luis F. et al. 2010. "Interleukin-15 Affects Patient Survival through Natural Killer Cell Recovery after Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Non-Hodgkin Lymphomas." *Clinical & developmental immunology* 2010:914945.
- Prod'homme, Virginie et al. 2007. "The Human Cytomegalovirus MHC Class I Homolog UL18 Inhibits LIR-1+ but Activates LIR-1- NK Cells." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 178(7):4473–81.
- Putz, Eva M. et al. 2017. "Targeting Cytokine Signaling Checkpoint CIS Activates NK Cells to Protect from Tumor Initiation and Metastasis." *Oncot Immunology* 6(2):e1267892. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1080/2162402X.2016.1267892>).
- Raulet, David H. 2003. "Roles of the NKG2D Immunoreceptor and Its Ligands." *Nature reviews. Immunology* 3(10):781–90.
- Raulet, David H. 2006. "Missing Self Recognition and Self Tolerance of Natural Killer (NK) Cells." *Seminars in Immunology* 18(3):145–50. Retrieved (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1044532306000406>).
- Remark, Romain et al. 2013. "Characteristics and Clinical Impacts of the Immune Environments in Colorectal and Renal Cell Carcinoma Lung Metastases: Influence of Tumor Origin." *Clinical Cancer Research* 19(15):4079–91.
- Rizzi, Rita et al. 2009. "Spontaneous Remission of 'methotrexate-Associated Lymphoproliferative Disorders' after Discontinuation of Immunosuppressive Treatment for Autoimmune Disease. Review of the Literature." *Medical Oncology* 26(1):1–9. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1007/s12032-008-9069-8>).
- Robbins, Scott H. et al. 2007. "Natural Killer Cells Promote Early CD8 T Cell Responses against Cytomegalovirus." *PLoS pathogens* 3(8):e123.
- Roder, J. C. and T. Haliotis. 1980. "Do NK Cells Play a Role in Anti-Tumor Surveillance?"



*Immunology today* 1(5):96–100.

Romagnani, Chiara et al. 2007. “CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> Killer Ig-Like Receptor<sup>-</sup> NK Cells Display Longer Telomeres and Acquire Features of CD56<sup>dim</sup> NK Cells upon Activation.” *The Journal of Immunology* 178(8):4947–4955. Retrieved (<http://www.jimmunol.org/content/178/8/4947.abstract>).

Romanski, Annette et al. 2016. “CD19-CAR Engineered NK-92 Cells Are Sufficient to Overcome NK Cell Resistance in B-Cell Malignancies.” *Journal of cellular and molecular medicine* 20(7):1287–94.

Romee, Rizwan, Jeffrey W. Leong, and Todd A. Fehniger. 2014. “Utilizing Cytokines to Function-Enable Human NK Cells for the Immunotherapy of Cancer.” *Scientifica* 2014:1–18. Retrieved (<http://www.hindawi.com/journals/scientifica/2014/205796/>).

Rothe, Mike, Ming Gui Pan, William J. Henzel, T.Merrill Ayres, and David V. Goeddel. 1995. “The TNFR2-TRAF Signaling Complex Contains Two Novel Proteins Related to Baculoviral Inhibitor of Apoptosis Proteins.” *Cell* 83(7):1243–52.

Rouas-Freiss, Nathalie, Philippe Moreau, Soldano Ferrone, and Edgardo D. Carosella. 2005. “HLA-G Proteins in Cancer: Do They Provide Tumor Cells with an Escape Mechanism?” *Cancer research* 65(22):10139–44.

Rubin, B. P. et al. 2001. “KIT Activation Is a Ubiquitous Feature of Gastrointestinal Stromal Tumors.” *Cancer research* 61(22):8118–21.

Rueff, Jessica, Michael Medinger, Dominik Heim, Jakob Passweg, and Martin Stern. 2014. “Lymphocyte Subset Recovery and Outcome after Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Plasma Cell Myeloma.” *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 20(6):896–99.

Ruggeri, Loredana et al. 2002. “Effectiveness of Donor Natural Killer Cell Alloreactivity in Mismatched Hematopoietic Transplants.” *Science (New York, N.Y.)* 295(5562):2097–2100.

- Rusakiewicz, Sylvie, M. Semeraro, et al. 2013. "Immune Infiltrates Are Prognostic Factors in Localized Gastrointestinal Stromal Tumors." *Cancer Research* 73(12):3499–3510. Retrieved (<http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-13-0371>).
- Rusakiewicz, Sylvie, Gaetane Nocturne, et al. 2013. "NCR3/NKp30 Contributes to Pathogenesis in Primary Sjogren's Syndrome." *Science translational medicine* 5(195):195ra96. Retrieved (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4237161&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Saez-Borderias, Andrea et al. 2009. "IL-12-Dependent Inducible Expression of the CD94/NKG2A Inhibitory Receptor Regulates CD94/NKG2C+ NK Cell Function." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 182(2):829–36.
- Sakamoto, Naoyuki et al. 2015. "Phase I Clinical Trial of Autologous NK Cell Therapy Using Novel Expansion Method in Patients with Advanced Digestive Cancer." *Journal of translational medicine* 13:277.
- Salavoura, Katerina, Aggeliki Kolialexi, George Tsangaris, and Ariadni Mavrou. 2008. "Development of Cancer in Patients with Primary Immunodeficiencies." *Anticancer Research* 28(2 B):1263–69.
- Salcedo, M. et al. 1998. "Fine Tuning of Natural Killer Cell Specificity and Maintenance of Self Tolerance in MHC Class I-Deficient Mice." *European journal of immunology* 28(4):1315–21.
- Salih, Helmut R., Hans-Georg Rammensee, and Alexander Steinle. 2002. "Cutting Edge: Down-Regulation of MICA on Human Tumors by Proteolytic Shedding." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 169(8):4098–4102.
- Sandel, M. H. et al. 2005. "Natural Killer Cells Infiltrating Colorectal Cancer and MHC Class I Expression." *Molecular immunology* 42(4):541–46.
- Sarkar, Subhashis et al. 2013. "Hypoxia Induced Impairment of NK Cell Cytotoxicity against Multiple Myeloma Can Be Overcome by IL-2 Activation of the NK Cells." *PloS one* 8(5):e64835.

- Saunders, Philippa M. et al. 2015. "A Bird's Eye View of NK Cell Receptor Interactions with Their MHC Class I Ligands." *Immunological reviews* 267(1):148–66.
- Scanlan, Matthew J., Andrew J. G. Simpson, and Lloyd J. Old. 2004. "The Cancer/testis Genes: Review, Standardization, and Commentary." *Cancer Immunity* 4:1–15.
- Schindler, Thomas et al. 2000. "Structural Mechanism for STI-571 Inhibition of Abelson Tyrosine Kinase." *Science* 289(5486):1938–42. Retrieved (<http://science.sciencemag.org/content/289/5486/1938>).
- Schioppa, T. et al. 2011. "B Regulatory Cells and the Tumor-Promoting Actions of TNF-during Squamous Carcinogenesis." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(26):10662–67. Retrieved (<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1100994108>).
- Schlecker, Eva et al. 2014. "Metalloprotease-Mediated Tumor Cell Shedding of B7-H6, the Ligand of the Natural Killer Cell-Activating Receptor NKp30." *Cancer Research* 74(13):3429–40.
- Schreiber, R. D., L. J. Old, and M. J. Smyth. 2011. "Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion." *Science* 331(6024):1565–70. Retrieved (<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1203486>).
- Schroder, Kate, Paul J. Hertzog, Timothy Ravasi, and David A. Hume. 2004. "Interferon- $\gamma$ : An Overview of Signals, Mechanisms and Functions." *Journal of leukocyte Biology* 75(February):163–89.
- Seaman, W. E., M. Sleisenger, E. Eriksson, and G. C. Koo. 1987. "Depletion of Natural Killer Cells in Mice by Monoclonal Antibody to NK-1.1. Reduction in Host Defense against Malignancy without Loss of Cellular or Humoral Immunity." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 138(12):4539–44.
- Seifert, Adrian M. et al. 2017. "PD-1/PD-L1 Blockade Enhances T-Cell Activity and Antitumor Efficacy of Imatinib in Gastrointestinal Stromal Tumors." *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 23(2):454–65.
- Semeraro, Michaela et al. 2015. "Clinical Impact of the NKp30/B7-H6 Axis in High-Risk

- Neuroblastoma Patients.” *Science Translational Medicine* 7(283):283ra55 LP-283ra55. Retrieved (<http://stm.sciencemag.org/content/7/283/283ra55.abstract>).
- Shankaran, Vijay et al. 2001. “IFN[gamma] and Lymphocytes Prevent Primary Tumour Development and Shape Tumour Immunogenicity.” *Nature* 410(6832):1107–11. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1038/35074122>).
- Sharpe, Arlene H., E. John Wherry, Rafi Ahmed, and Gordon J. Freeman. 2007. “The Function of Programmed Cell Death 1 and Its Ligands in Regulating Autoimmunity and Infection.” *Nat Immunol* 8(3):239–45. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1038/ni1443>).
- Shemesh, Avishai et al. 2015. “First Trimester Pregnancy Loss and the Expression of Alternatively Spliced Nkp30 Isoforms in Maternal Blood and Placental Tissue.” *Frontiers in immunology* 6(June):189. Retrieved (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4450658&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Shibuya, A. et al. 1996. “DNAM-1, a Novel Adhesion Molecule Involved in the Cytolytic Function of T Lymphocytes.” *Immunity* 4(6):573–81.
- Shimura, Satoru et al. 2000. “Reduced Infiltration of Tumor-Associated Macrophages in Human Prostate Cancer: Association with Cancer Progression.” *Cancer Research* 60:5857–61. Retrieved (<http://cancerres.aacrjournals.org/content/60/20/5857.abstract>).
- Shu, H. B., M. Takeuchi, and D. V Goeddel. 1996. “The Tumor Necrosis Factor Receptor 2 Signal Transducers TRAF2 and c-IAP1 Are Components of the Tumor Necrosis Factor Receptor 1 Signaling Complex.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(24):13973–78.
- Silver, Jonathan S. et al. 2016. “Inflammatory Triggers Associated with Exacerbations of COPD Orchestrate Plasticity of Group 2 Innate Lymphoid Cells in the Lungs.” *Nature immunology* 17(6):626–35.
- Simhadri, Venkateswara Rao et al. 2008. “Dendritic Cells Release HLA-B-Associated Transcript-3 Positive Exosomes to Regulate Natural Killer Function.” *PloS one* 3(10):e3377.

- Sivori, S. et al. 1999. "NKp46 Is the Major Triggering Receptor Involved in the Natural Cytotoxicity of Fresh or Cultured Human NK Cells. Correlation between Surface Density of NKp46 and Natural Cytotoxicity against Autologous, Allogeneic or Xenogeneic Target Cells." *European journal of immunology* 29(5):1656–66.
- Slamon, Dennis et al. 2011. "Adjuvant Trastuzumab in HER2-Positive Breast Cancer." *New England Journal of Medicine* 365(14):1273–83. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa0910383>).
- Smyth, M. J., N. Y. Crowe, and D. I. Godfrey. 2001. "NK Cells and NKT Cells Collaborate in Host Protection from Methylcholanthrene-Induced Fibrosarcoma." *International immunology* 13(4):459–63.
- Smyth, Mark J. et al. 2000. "Perforin-Mediated Cytotoxicity Is Critical for Surveillance of Spontaneous Lymphoma." *The Journal of Experimental Medicine* 192(5):755–60. Retrieved (<http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.192.5.755>).
- Smyth, Mark J. et al. 2005. "NKG2D Function Protects the Host from Tumor Initiation." *The Journal of experimental medicine* 202(5):583–88.
- Smyth, Mark J. 2008. "NK Cells and NKT Cells Collaborate in Host Protection from Methylcholanthrene-Induced Fibrosarcoma." *International Immunology* 20(4):631.
- Smyth, Mark J., Shayna E. A. Street, and Joseph A. Trapani. 2003. "Cutting Edge: Granzymes A and B Are Not Essential for Perforin-Mediated Tumor Rejection." *The Journal of Immunology* 171(2):515–18. Retrieved (<http://www.jimmunol.org/content/171/2/515>).
- Sola, C. et al. 2016. "NKG2A Immune Checkpoint Blockade Enhances the Anti-Tumor Efficacy of PD-1 / PD-L1 Inhibitors in a Preclinical Model." *AACR poster* 2342.
- Song, Hyunkeun et al. 2006. "IL-2/IL-18 Prevent the down-Modulation of NKG2D by TGF-Beta in NK Cells via the c-Jun N-Terminal Kinase (JNK) Pathway." *Cellular immunology* 242(1):39–45.
- Spits, Hergen, Jochem H. Bernink, and Lewis Lanier. 2016. "NK Cells and Type 1 Innate Lymphoid Cells: Partners in Host Defense." *Nature Immunology* 17(7):758–64. Retrieved (<http://www.nature.com/doi/10.1038/ni.3482>).

- Sprick, M. R. et al. 2000. "FADD/MORT1 and Caspase-8 Are Recruited to TRAIL Receptors 1 and 2 and Are Essential for Apoptosis Mediated by TRAIL Receptor 2." *Immunity* 12(6):599–609.
- Stanietsky, Noa et al. 2009. "The Interaction of TIGIT with PVR and PVRL2 Inhibits Human NK Cell Cytotoxicity." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(42):17858–63.
- Stojanovic, A. and A. Cerwenka. 2011. "Natural Killer Cells and Solid Tumors." *Journal of Innate Immunity* 3(4):355–64. Retrieved (<http://www.karger.com/DOI/10.1159/000325465>).
- Stojanovic, Ana, Nathalie Fiegler, Monika Brunner-Weinzierl, and Adelheid Cerwenka. 2014. "CTLA-4 Is Expressed by Activated Mouse NK Cells and Inhibits NK Cell IFN- $\gamma$  Production in Response to Mature Dendritic Cells." *The Journal of Immunology* 192(9):4184–91. Retrieved (<http://www.jimmunol.org/content/192/9/4184>).
- von Strandmann, Elke Pogge et al. 2006. "A Novel Bispecific Protein (ULBP2-BB4) Targeting the NKG2D Receptor on Natural Killer (NK) Cells and CD138 Activates NK Cells and Has Potent Antitumor Activity against Human Multiple Myeloma in Vitro and in Vivo." *Blood* 107(5):1955–62.
- Street, S. E., E. Cretney, and M. J. Smyth. 2001. "Perforin and Interferon-Gamma Activities Independently Control Tumor Initiation, Growth, and Metastasis." *Blood* 97(1):192–97. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11133760>).
- Street, Shayna E. A., Joseph A. Trapani, Duncan MacGregor, and Mark J. Smyth. 2002. "Suppression of Lymphoma and Epithelial Malignancies Effected by Interferon Gamma." *The Journal of experimental medicine* 196(1):129–34.
- Stutman, O. 1979. "Spontaneous Tumors in Nude Mice: Effect of the Viable Yellow Gene." *Pathobiology* 47(2):129–35. Retrieved (<http://www.karger.com/DOI/10.1159/000162929>).
- Stutman, Osias. 1974. "Tumor Development after 3-Methylcholanthrene in Immunologically Deficient Athymic-Nude Mice." *Science* 183(4124):534 LP-536. Retrieved (<http://science.sciencemag.org/content/183/4124/534.abstract>).

- Sullivan, J. L., K. S. Byron, F. E. Brewster, and D. T. Purtilo. 1980. "Deficient Natural Killer Cell Activity in X-Linked Lymphoproliferative Syndrome." *Science (New York, N.Y.)* 210(4469):543–45.
- Sullivan, L. C., C. S. Clements, J. Rossjohn, and A. G. Brooks. 2008. "The Major Histocompatibility Complex Class Ib Molecule HLA-E at the Interface between Innate and Adaptive Immunity." *Tissue antigens* 72(5):415–24.
- Sun, Joseph C., Joshua N. Beilke, and Lewis L. Lanier. 2009. "Adaptive Immune Features of Natural Killer Cells." *Nature* 457(7229):557–61.
- Sun, Joseph C., Joshua N. Beilke, and Lewis L. Lanier. 2010. "Immune Memory Redefined: Characterizing the Longevity of Natural Killer Cells." *Immunological Reviews* 236(1):83–94.
- Sun, Joseph C. and Lewis L. Lanier. 2008. "Cutting Edge: Viral Infection Breaks NK Cell Tolerance to Missing Self." *The Journal of Immunology* 181(11):7453–57. Retrieved (<http://www.jimmunol.org/content/181/11/7453>).
- Talmadge, J. E., K. M. Meyers, D. J. Prieur, and J. R. Starkey. 1980. "Role of NK Cells in Tumour Growth and Metastasis in Beige Mice." *Nature* 284(5757):622–24.
- Tamaki, Shigehiro et al. 2010. "Soluble MICB Serum Levels Correlate with Disease Stage and Survival Rate in Patients with Oral Squamous Cell Carcinoma." *Anticancer research* 30(10):4097–4101.
- Tang, Qin et al. 2008. "Umbilical Cord Blood T Cells Express Multiple Natural Cytotoxicity Receptors after IL-15 Stimulation, but Only NKp30 Is Functional." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 181(7):4507–15.
- Tartour, E. et al. 1999. "Interleukin 17, a T-Cell-Derived Cytokine, Promotes Tumorigenicity of Human Cervical Tumors in Nude Mice." *Cancer research* 59(15):3698–3704.
- Tay, C. H. and R. M. Welsh. 1997. "Distinct Organ-Dependent Mechanisms for the Control of Murine Cytomegalovirus Infection by Natural Killer Cells." *Journal of virology* 71(1):267–75. Retrieved

(<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=191047&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).

Textor, Sonja et al. 2011. "Human NK Cells Are Alerted to Induction of p53 in Cancer Cells by Upregulation of the NKG2D Ligands ULBP1 and ULBP2." *Cancer research* 71(18):5998–6009.

Tilburgs, Tamara, J. Henry Evans, Angela C. Crespo, and Jack L. Strominger. 2015. "The HLA-G Cycle Provides for Both NK Tolerance and Immunity at the Maternal-Fetal Interface." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112(43):13312–17.

Tlsty, Thea D. and Lisa M. Coussens. 2006. "Tumor Stroma and Regulation of Cancer Development." *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 1(1):119–50. Retrieved (<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.pathol.1.110304.100224>).

Tonn, Torsten et al. 2013. "Treatment of Patients with Advanced Cancer with the Natural Killer Cell Line NK-92." *Cytotherapy* 15(12):1563–70.

Tosolini, Marie et al. 2011. "Clinical Impact of Different Classes of Infiltrating T Cytotoxic and Helper Cells (Th1, th2, Treg, th17) in Patients with Colorectal Cancer." *Cancer research* 71(4):1263–71.

Tripathi, Piyush and Suraksha Agrawal. 2006. "Non-Classical HLA-G Antigen and Its Role in the Cancer Progression." *Cancer Investigation* 24(2):178–86. Retrieved (<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/07357900500524579>).

Tsitsikov, Erdyni N. et al. 2001. "TRAF1 Is a Negative Regulator of TNF Signaling: Enhanced TNF Signaling in TRAF1-Deficient Mice." *Immunity* 15(4):647–57.

Vales-Gomez, M., H. T. Reyburn, M. Mandelboim, and J. L. Strominger. 1998. "Kinetics of Interaction of HLA-C Ligands with Natural Killer Cell Inhibitory Receptors." *Immunity* 9(3):337–44.

Vallera, Daniel A. et al. 2016. "IL15 Trispecific Killer Engagers (TriKE) Make Natural Killer Cells Specific to CD33+ Targets While Also Inducing Persistence, In Vivo Expansion, and



- Enhanced Function.” *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 22(14):3440–50.
- Verrier, Thomas et al. 2016. “Phenotypic and Functional Plasticity of Murine Intestinal NKp46+ Group 3 Innate Lymphoid Cells.” *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 196(11):4731–38.
- Vey, Norbert et al. 2012. “A Phase 1 Trial of the Anti-Inhibitory KIR mAb IPH2101 for AML in Complete Remission.” *Blood* 120(22):4317 LP-4323. Retrieved (<http://www.bloodjournal.org/content/120/22/4317.abstract>).
- Viaud, Sophie et al. 2009. “Dendritic Cell-Derived Exosomes Promote Natural Killer Cell Activation and Proliferation: A Role for NKG2D Ligands and IL-15Ralpha.” *PloS one* 4(3):e4942.
- Vieillard, Vincent, Jack L. Strominger, and Patrice Debre. 2005. “NK Cytotoxicity against CD4+ T Cells during HIV-1 Infection: A gp41 Peptide Induces the Expression of an NKp44 Ligand.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(31):10981–86.
- Villegas, Francisco R. et al. 2002. “Prognostic Significance of Tumor Infiltrating Natural Killer Cells Subset CD57 in Patients with Squamous Cell Lung Cancer.” *Lung Cancer* 35(1):23–28. Retrieved (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169500201002926>).
- Vitale, Chiara et al. 2004. “The Corticosteroid-Induced Inhibitory Effect on NK Cell Function Reflects down-Regulation And/or Dysfunction of Triggering Receptors Involved in Natural Cytotoxicity.” *European journal of immunology* 34(11):3028–38.
- Vitale, M. et al. 1998. “NKp44, a Novel Triggering Surface Molecule Specifically Expressed by Activated Natural Killer Cells, Is Involved in Non-Major Histocompatibility Complex-Restricted Tumor Cell Lysis.” *The Journal of experimental medicine* 187(12):2065–72.
- Vivier, E. et al. 2011. “Innate or Adaptive Immunity? The Example of Natural Killer Cells.” *Science* 331(6013):44–49. Retrieved (<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1198687>).
- Vivier, Eric, Elena Tomasello, Myriam Baratin, Thierry Walzer, and Sophie Ugolini. 2008.

- “Functions of Natural Killer Cells.” *Nature Immunology* 9(5):503–10. Retrieved (<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ni1582>).
- Vivier, Eric, Sophie Ugolini, Didier Blaise, Christian Chabannon, and Laurent Brossay. 2012. “Targeting Natural Killer Cells and Natural Killer T Cells in Cancer.” *Nature Reviews Immunology* 12(4):239–52. Retrieved (<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nri3174>).
- Voskoboinik, Ilia, James C. Whisstock, and Joseph A. Trapani. 2015. “Perforin and Granzymes: Function, Dysfunction and Human Pathology.” *Nat Rev Immunol* 15(6):388–400. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1038/nri3839>).
- Wajant, H., K. Pfizenmaier, and P. Scheurich. 2003. “Tumor Necrosis Factor Signaling.” *Cell Death and Differentiation* 10(1):45–65. Retrieved (<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/sj.cdd.4401189>).
- Walzer, Thierry, Marc Dalod, Eric Vivier, and Laurence Zitvogel. 2005. “Natural Killer Cell-Dendritic Cell Crosstalk in the Initiation of Immune Responses.” *Expert opinion on biological therapy* 5 Suppl 1:S49-59.
- Wang, Lin et al. 2009. “IL-17 Can Promote Tumor Growth through an IL-6-Stat3 Signaling Pathway.” *The Journal of experimental medicine* 206(7):1457–64.
- Wang, Wei et al. 2014. “Tumor-Released Galectin-3, a Soluble Inhibitory Ligand of Human Nkp30, Plays an Important Role in Tumor Escape from NK Cell Attack.” *The Journal of biological chemistry* 289(48):33311–19.
- Watzl, Carsten and Eric O. Long. 2010. “Signal Transduction During Activation and Inhibition of Natural Killer Cells.” *Curr Protoc Immunol*.
- Whiteside, Theresa L. 2014. “Regulatory T Cell Subsets in Human Cancer: Are They Regulating for or against Tumor Progression?” *Cancer Immunology, Immunotherapy* 63(1):67–72. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1007/s00262-013-1490-y>).
- Willimsky, Gerald and Thomas Blankenstein. 2005. “Sporadic Immunogenic Tumours Avoid Destruction by Inducing T-Cell Tolerance.” *Nature* 437(7055):141–46. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1038/nature03954>).

- Wu, Ming-Ru et al. 2015. "B7H6-Specific Bispecific T Cell Engagers Lead to Tumor Elimination and Host Antitumor Immunity." *The Journal of Immunology* 194(11):5305–11. Retrieved (<http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1402517>).
- Xavier, Ana C. and Jeffrey W. Taub. 2010. "Acute Leukemia in Children with down Syndrome." *Haematologica* 95(7):1043–45.
- Yabe, T. et al. 1993. "A Multigene Family on Human Chromosome 12 Encodes Natural Killer-Cell Lectins." *Immunogenetics* 37(6):455–60.
- Yamaguchi, Kosuke et al. 2012. "Diagnostic and Prognostic Impact of Serum-Soluble UL16-Binding Protein 2 in Lung Cancer Patients." *Cancer science* 103(8):1405–13.
- Yan, Lin et al. 2015. "Clinicopathological Significance of c-KIT Mutation in Gastrointestinal Stromal Tumors: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Scientific Reports* 5(1):13718. Retrieved (<http://www.nature.com/articles/srep13718>).
- Yokoyama, Wayne M., Sungjin Kim, and Anthony R. French. 2004. "The Dynamic Life of Natural Killer Cells." *Annual Review of Immunology* 22(1):405–29. Retrieved (<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104711>).
- Yu, Jianhua et al. 2011. "NKp46 Identifies an NKT Cell Subset Susceptible to Leukemic Transformation in Mouse and Human." *The Journal of clinical investigation* 121(4):1456–70.
- Yu, Jianhua, Aharon G. Freud, and Michael A. Caligiuri. 2013. "Location and Cellular Stages of Natural Killer Cell Development." *Trends in Immunology* 34(12):573–82. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2013.07.005>).
- Zamai, Loris et al. 1998. "Natural Killer (NK) Cell-mediated Cytotoxicity: Differential Use of TRAIL and Fas Ligand by Immature and Mature Primary Human NK Cells." *The Journal of Experimental Medicine* 188(12):2375 LP-2380. Retrieved (<http://jem.rupress.org/content/188/12/2375.abstract>).
- Zhang, Congcong et al. 2016. "ErbB2/HER2-Specific NK Cells for Targeted Therapy of Glioblastoma." *Journal of the National Cancer Institute* 108(5).
- Zhang, Jing-Ping et al. 2009. "Increased Intratumoral IL-17-Producing Cells Correlate with

Poor Survival in Hepatocellular Carcinoma Patients.” *Journal of hepatology* 50(5):980–89.

Zhang, Lin et al. 2003. “Intratumoral T Cells, Recurrence, and Survival in Epithelial Ovarian Cancer.” *New England Journal of Medicine* 348(3):203–13. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa020177>).

Zhang, Rong et al. 2003. “Etk/Bmx Transactivates Vascular Endothelial Growth Factor 2 and Recruits Phosphatidylinositol 3-Kinase to Mediate the Tumor Necrosis Factor-Induced Angiogenic Pathway.” *The Journal of biological chemistry* 278(51):51267–76.

Zou, Weiping. 2006. “Regulatory T Cells, Tumour Immunity and Immunotherapy.” *Nature Reviews Immunology* 6(4):295–307. Retrieved (<http://www.nature.com/doi/10.1038/nri1806>).

Zwirner, Norberto W. and Carolina I. Domaica. 2010. “Cytokine Regulation of Natural Killer Cell Effector Functions.” *BioFactors* 36(4):274–88. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1002/biof.107>).

**Titre :** Valeur prédictive du récepteur NKp30 dans la réponse à l'imatinib mesylate des tumeurs stromales gastrointestinales et identification d'un nouveau mécanisme inhibiteur des cellules Natural Killer par la voie TNF $\alpha$ /TNFR2/BIRC3/TRAF1

**Mots clés :** Cellules NK, GIST, NKp30, TNF $\alpha$ , BIRC3, TRAF1

**Résumé :** Depuis ces 10 dernières années, l'immunothérapie est à l'avant-garde de la thérapie anticancéreuse. Les cellules Natural Killer (NK) font partie du système immunitaire inné et possèdent la capacité unique de lyser les cellules tumorales sans activation préalable par un antigène spécifique. Elles jouent un rôle majeur dans le contrôle de plusieurs cancers hématologiques et solides dont les tumeurs stromales gastrointestinales (GIST). Leur activation dépend de l'équilibre entre leurs récepteurs activateurs et inhibiteurs. Les Natural Cytotoxicity Receptors (NCR) font partis des récepteurs activateurs les plus importants dans leur reconnaissance des cibles et comprennent le NKp30, NKp44 et NKp46. Le NKp30 possède 3 isoformes: NKp30a et NKp30b sont immunostimulantes induisant la sécrétion d'Interféron (IFN)  $\gamma$  et de Tumor necrosis factor (TNF)  $\alpha$  alors que NKp30c est immunosuppressive favorisant la production d'interleukine 10 (IL-10). L'IFN $\gamma$  est un puissant activateur des cellules immunitaires tandis que l'IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire. Le TNF $\alpha$  a été décrit initialement comme un facteur sérique induisant la nécrose des tumeurs, cependant son rôle a depuis été élargi à des fonctions homéostatiques. De nombreuses études laissent à penser que les fonctions antitumorales des cellules NK ne se limitent pas à l'élimination des cellules tumorales. Malgré les progrès importants réalisés dans la compréhension des cellules NK, de nombreux travaux sont encore à mener pour exploiter pleinement leur potentiel antitumoral.

Notre équipe a démontré l'importance capitale des cellules NK dans les GIST. Ainsi l'infiltrat NK prédit la survie sans progression des patients. De plus nous avons montré que l'expression préférentielle de l'isoforme immunosuppressive NKp30c impactait négativement le pronostic des patients GIST. Suite à ces résultats, nous avons cherché à mieux caractériser l'impact des isoformes du récepteur NKp30 chez les patients GIST en réponse à l'IM.

Dans un premier temps, nous avons démontré qu'un haut ratio d'expression entre NKp30b et NKp30c prédisait une meilleure réponse à l'imatinib mesylate (IM, un inhibiteur de tyrosine kinase, traitement de référence des GIST) et que l'expression des isoformes de NKp30 impactait l'environnement cytokinique de la tumeur. De plus, nous avons établi pour la première fois le lien entre la présence de ligands solubles de NKp30, B7 Homolog 6 soluble (sB7-H6) et BCL2 Associated Athanogene 6 soluble (sBAG6), et la diminution de la survie sans événement des patients GIST traités à l'IM.

Malgré l'infiltration immunitaire de nombreuses tumeurs, les fonctions antitumorales des lymphocytes sont inhibées par le microenvironnement tumoral. Ainsi, nous avons étudié quelles voies de signalisation étaient associées à l'inhibition des cellules NK présentes dans cet environnement. Pour cela, nous avons réalisé un microarray à partir des cellules NK infiltrant les GIST et avons mis en évidence le rôle délétère de la voie TNF $\alpha$ /TNF Receptor 2/Baculoviral IAP Repeat Containing 3 (BIRC3)/TNF Receptor Associated Factor 1 (TRAF1) dans la fonctionnalité des cellules NK. En effet, l'activation de cette voie dans les cellules NK entraîne la diminution de la transcription du gène du récepteur activateur NKp46 ainsi que son expression membranaire. Cette diminution était corrélée avec l'expression de l'isoforme NKp30c. Par ailleurs, nous avons pu mettre en évidence chez la souris que le TNF $\alpha$  facilitait la dissémination métastatique de la lignée tumorale sensible aux cellules NK B16F10.

Nos résultats sur les cellules NK ont renforcé leur grand potentiel en tant que cible thérapeutique pour l'immunothérapie anticancéreuse. En effet, l'importance du récepteur NKp30 et de ses isoformes dans la prédiction de la réponse à l'IM dans les GIST et la mise en évidence d'un nouveau mécanisme inhibiteur des cellules NK par la voie TNF $\alpha$ /TNFR2/BIRC3/TRAF1 ouvrent la voie à de nouvelles stratégies dans le traitement des cancers.

**Title :** Predictive value of the NKp30 receptor in the imatinib mesylate response of gastrointestinal stromal tumors and identification of a novel Natural Killer cell inhibitory mechanism via the TNF $\alpha$ /TNFR2/BIRC3/TRAF1 pathway

**Keywords :** NK cells, GIST, NKp30, TNF $\alpha$ , TRAF1, BIRC3

**Abstract:** Over the last 10 years, immunotherapy has been at the forefront of cancer therapy. Natural Killer (NK) cells are part of the innate immune system and have the unique ability to lyse tumor cells without any antigen specific priming. They have a key prognostic role in several hematological and solid cancers including gastrointestinal stromal tumors (GIST). A balance between activating and inhibitory receptors triggers NK cell activation. Natural cytotoxicity receptors (NCR) are among the most clinically relevant activating receptors and include NKp30, NKp44 and NKp46. NKp30 can be expressed in 3 different isoforms: NKp30a and NKp30b are both immunostimulatory, inducing interferon (IFN)  $\gamma$  and tumor necrosis factor (TNF)  $\alpha$  secretion whereas NKp30c is immunosuppressive, producing interleukin 10 (IL-10). IFN $\gamma$  is a potent activator of immune cells whereas IL-10 is an anti-inflammatory cytokine. TNF $\alpha$  was first described as a serum factor, inducing tumor necrosis but its role has since been broadened to homeostatic functions. Ample evidence suggests that anti-tumor functions of NK cells are tightly regulated and expand far beyond the simple killing of malignant cells. Despite the tremendous progress in understanding NK cell biology, further work is warranted to fully exploit the anticancer potential of these cells.

Our group demonstrated the crucial role that NK cells have in GIST. Indeed, NK cell infiltrate positively correlates with progression-free survival. Moreover, we showed that the preferential expression of the immunosuppressive isoform NKp30c, negatively impacts the clinical outcome of GIST patients. To further extend these observations, we explored the influence of various NKp30 isoforms in GIST patients.

Firstly, we revealed that a high ratio between the expression of NKp30b and NKp30c isoforms predicted a stronger imatinib mesylate (IM) response (a tyrosine kinase inhibitor, TKI – first line standard of care in GIST) and that tumor cytokine milieu is modified following NKp30 isoform expression.

Furthermore, we demonstrated a link between the presence of soluble ligands of NKp30, soluble B7 Homolog 6 (sB7-H6) and soluble BCL2 Associated Athanogene 6 (sBAG6), and a decrease in event-free survival in IM-treated GIST patients.

Despite the presence of immune infiltration in many tumors, antitumor functions of lymphocytes are inhibited by the tumor microenvironment. Thus, we explored which signaling pathways were associated with NK cell inhibition in the tumor microenvironment. To do so, we performed a microarray from GIST infiltrating NK cells which highlighted the deleterious effect of TNF $\alpha$ /TNF Receptor 2/Baculoviral IAP Repeat Containing 3 (BIRC3)/TNF Receptor Associated Factor 1 (TRAF1) pathway on the function of NK cells. Next, we demonstrated that activation of this pathway in NK cells decreased gene transcription and protein expression of the activating receptor NKp46 (also called Natural Cytotoxicity Triggering Receptor 1 NCR1). This decrease positively correlated with NKp30c isoform expression. Moreover we showed that in mice, TNF $\alpha$  increases the metastatic dissemination of the NK sensitive tumor cell line, B16F10.

Results from our research on NK cells strengthen the potential of NK cells as a therapeutic target for anti-tumor immunotherapy. Taken together, this thesis demonstrates the key role of the NKp30 receptor and its isoforms in the IM therapy as predictive marker in GIST response and describes for the first time a new NK cell inhibitory mechanism via the TNF $\alpha$ /TNFR2/BIRC3/TRAF1 pathway, paving the way for novel therapeutic strategies in cancer treatment.

