



**HAL**  
open science

# Défauts fonctionnels des cellules NK en contexte de stimulation chronique

Marie Marotel

► **To cite this version:**

Marie Marotel. Défauts fonctionnels des cellules NK en contexte de stimulation chronique. Immunologie. Université de Lyon, 2019. Français. NNT : 2019LYSE1234 . tel-02463463

**HAL Id: tel-02463463**

**<https://theses.hal.science/tel-02463463>**

Submitted on 1 Feb 2020

**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.



N°d'ordre NNT : 2018LYSE1234

## **THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON**

opérée au sein de

**L'Université Claude Bernard Lyon 1**

**École Doctorale n°340**

**(Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire)**

**Spécialité de doctorat** : Immunologie

**Discipline** : Biologie

Soutenue publiquement le 19/11/2019, par :

**Marie MAROTEL**

---

# **DÉFAUTS FONCTIONNELS DES CELLULES NK EN CONTEXTE DE STIMULATION CHRONIQUE**

---

Devant le jury composé de :

Dr Valérie DARDALHON, Chargée de recherche, CNRS, Montpellier, Rapporteur  
Dr Ludovic MARTINET, Chargé de recherche, INSERM, Toulouse, Rapporteur

Pr Sophie CAILLAT-ZUCMAN, PU-PH, Hôpital Saint-Louis, Paris Examinatrice  
Pr Véronique LOUSTAUD-RATTI, PU-PH, Université De Limoges, Examinatrice  
Pr Olivier THAUNAT, PU-PH, Université Claude Bernard Lyon 1, Examineur  
Dr Thierry WALZER, Directeur de recherche, INSERM, Lyon, Examineur

Dr Uzma HASAN, Chargée de recherche, INSERM, Lyon, Directrice de thèse  
Dr Antoine MARÇAIS, Chargé de recherche, INSERM, Lyon, Co-directeur de thèse





N°d'ordre NNT : 2018LYSE1234

## **THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON**

opérée au sein de

**L'Université Claude Bernard Lyon 1**

**École Doctorale n°340**

**(Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire)**

**Spécialité de doctorat** : Immunologie

**Discipline** : Biologie

Soutenue publiquement le 19/11/2019, par :

**Marie MAROTEL**

---

# **DÉFAUTS FONCTIONNELS DES CELLULES NK EN CONTEXTE DE STIMULATION CHRONIQUE**

---

Devant le jury composé de :

Dr Valérie DARDALHON, Chargée de recherche, CNRS, Montpellier, Rapporteur  
Dr Ludovic MARTINET, Chargé de recherche, INSERM, Toulouse, Rapporteur

Pr Sophie CAILLAT-ZUCMAN, PU-PH, Hôpital Saint-Louis, Paris Examinatrice  
Pr Véronique LOUSTAUD-RATTI, PU-PH, Université De Limoges, Examinatrice  
Pr Olivier THAUNAT, PU-PH, Université Claude Bernard Lyon 1, Examineur  
Dr Thierry WALZER, Directeur de recherche, INSERM, Lyon, Examineur

Dr Uzma HASAN, Chargée de recherche, INSERM, Lyon, Directrice de thèse  
Dr Antoine MARÇAIS, Chargé de recherche, INSERM, Lyon, Co-directeur de thèse





## **Université Claude Bernard – LYON 1**

Président de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. Philippe CHEVALLIER
Vice-Président de la Commission de Recherche	
Directeur Général des Services	M. Damien VERHAEGHE

### **COMPOSANTES SANTE**

Faculté de Médecine Lyon-Est – Claude Bernard	Doyen : M. Gilles RODE
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud Charles. Mérieux	Doyenne : Mme Carole BURILLON
UFR d'Odontologie	Doyenne : Mme Dominique SEUX
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. Xavier PERROT
Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT

### **COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE**

UFR Biosciences	Directrice : Mme Kathrin GIESELER
Département Génie Electrique et des Procédés (GEP)	Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO
Département Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur M. Marc BUFFAT
UFR - Faculté des Sciences	Administrateur provisoire : M. Bruno ANDRIOLETTI
UFR (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Ecole Polytechnique Universitaire Lyon 1	Directeur : Emmanuel PERRIN
Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon)	Directeur : Gérard PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. Christophe VITON
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
ESPE	Administrateur Provisoire : M. Pierre CHAREYRON

## **Résumé en français**

Les cellules NK sont des lymphocytes de l'immunité innée qui ont un rôle majeur dans le contrôle précoce des infections virales et dans l'immunosurveillance des tumeurs. Cependant, en cas de stimulation chronique, un état d'anergie, où les cellules NK n'exercent plus leur fonction a été mis en évidence. Les mécanismes conduisant à cette perte de fonction demeurent mal caractérisés et nous ne savons pas s'il s'agit d'une cause ou d'une conséquence de la chronicité. Cibler les cellules NK constitue une perspective thérapeutique de choix mais nécessite une meilleure compréhension de ces aspects. L'objectif de ce travail de thèse s'est articulé autour de trois points. Premièrement, nous avons généré un modèle tumoral murin sensible aux cellules NK permettant l'étude de la réponse anti-tumorale et l'établissement d'une stimulation chronique. Deuxièmement, l'utilisation de ce modèle a permis d'étudier les mécanismes conduisant à la perte de fonctionnalité des cellules NK et de tester des stratégies de restauration. Enfin, nous avons mené une étude parallèle, chez l'homme, par analyse d'une cohorte de patients chroniquement infectés par le virus de l'Hépatite B dans le but de déterminer le phénotype des cellules NK et d'identifier les causes conduisant à leur perte de fonction dans ce contexte.

## **Titre en anglais**

NK cell dysfunction in chronic stimulation context

## **Résumé en anglais**

NK cells are innate lymphocytes which play a crucial role in the early control of viral infection and in tumor immunosurveillance. However, a state of anergy, where NK cells are poorly functional can be reached in chronic stimulation context. The mechanisms leading to this process remain weakly understood and whether this is a cause or a consequence of chronicity is unknown. Targeting NK cells appears as a potent therapeutic strategy but requires further investigations. This work had three main objectives. First, we have engineered a tumoral mouse model strongly immunogenic for NK cells that allow us to study the anti-tumoral response of NK cells and to trigger chronic stimulation. Then, we use this model to investigate the mechanisms driving NK cell loss of functions and to test potential therapeutic strategies to reverse this state. Finally, we have conducted a human study by analyzing samples from HBV chronically infected patients in order to determine the phenotype of NK cells and identify the drivers of NK cell dysfunction in this context.

## **Discipline**

Immunologie

## **Mots clés**

Cellules Natural Killer, surveillance anti-tumorale, VHB, épuisement

## **Intitulé et adresse du laboratoire**

Innate immunity in infectious and autoimmune diseases  
CIRI, INSERM U1111  
21 Avenue Tony Garnier  
69007 Lyon

# REMERCIEMENTS

## *Aux membres du jury*

J'aimerais tout d'abord remercier Monsieur le Pr. Olivier Thauvat pour avoir accepté de présider mon jury de thèse et pour avoir examiné mon travail ainsi que le Dr. Valérie Dardalhon et le Dr. Ludovic Martinet pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce manuscrit. Enfin, je remercie également Madame la Pr. Sophie Caillat et Madame la Pr Véronique Loustaud-Ratti d'avoir examiné mes recherches.

## *A mes directeurs de thèse,*

Antoine, merci de m'avoir transmis ta connaissance, d'avoir répondu à toutes mes questions absolument tous les jours, d'avoir autant été disponible, tu m'as permis de grandir au fur et à mesure de la thèse, d'ouvrir mon esprit scientifique et mes capacités de réflexion. Merci aussi pour ton aide avec ces supers manips où il fallait réaliser 15 tris dans la journée. Uzma, je te remercie de m'avoir accueillie en tant que petite stagiaire de M1, pour m'avoir autant fait confiance et pour tout ce que tu m'as appris.

## *A Thierry, notre chef d'équipe*

Merci de nous booster comme tu le fais, merci pour toutes les discussions et conseils, pour ta confiance, et merci d'avoir fait les mix frigos et écrasé les foies. A vous 3, vous avez su me guider à travers cette fabuleuse aventure.

## *A la team Walzer,*

Maman Michelle, ma maman du labo, merci pour toutes ces pauses partagées, et surtout pour ta bienveillance quotidienne, ainsi que pour la relation que l'on a qui va bien au-delà de collègues. Ma petite Annabelle, merci pour toute ton aide dans ce projet, ton soutien très important pour moi, pour toutes les petites choses qui rendent le quotidien au labo plus fun, et surtout pour ton aide tellement précieuse lors d'un moment particulièrement difficile. Marine, pour ton expertise et pour toutes ces heures passées à discuter dans notre petite pièce en injectant les souris ; sans tes mains habiles, ce travail n'aurait pas été possible, merci également de nous avoir formées Annabelle et moi. Aurore, merci à toi aussi pour ton aide et ton implication dans le projet et pour m'avoir relayée certains week-ends à l'animalerie. Aux girls d'Antoine, Emilie (ma petite filleule préférée), Sophie (ma voisine de bureau, merci pour tous nos bavardages), Yamila qui a apporté tellement de rires et de bonne humeur à l'équipe, et Laurie (merci pour les années Lyon Sud et mes débuts en cytométrie), on aura eu beaucoup de fous rires, et je vous remercie pour votre aide dans les manips et dans l'organisation du 2<sup>e</sup> ;) Vous êtes toutes devenues de super amies. Ommar mon PhD partner, je suis contente d'avoir partagé toutes ces années avec toi et j'espère que l'on continuera notre carrière ensemble, et même si nos chemins vont s'égarer avec le post-doc, je compte sur toi pour être mon co-PI ! Merci à ma petite stagiaire Marine, tu as eu beaucoup de volonté pour t'engager dans ce

projet, merci pour toutes tes blagues et les fous-rires que l'on a pu avoir au cours de ton stage, je te souhaite le meilleur à Marseille.

A tous les membres de ladite team Walzer que je n'ai pas encore cités, merci pour cette ambiance de folie ! Notre famille s'agrandit toujours un peu plus, j'ai tellement aimé travailler avec vous, vous allez tous énormément me manquer. Anne-Laure, Seb, Alex, vous aussi vous avez participé à cette étude par des conseils ou des manips et je vous en remercie ! Antoinette, Marion, Jiang bon courage pour la fin de la thèse, je suis sûre que vous finirez en beauté !

Enfin, aux membres passés et à tous les stagiaires que j'ai eu la chance de rencontrer pendant cette thèse, Sébastien F, Guillaume, Salomé, Elliott, Lucie, Oanh, Etienne, Kyohei, tous d'horizons différents, c'est aussi ce qui fait la richesse de travailler dans un labo. Mes remerciements vont aussi particulièrement à Issam, pour les manips du projet HBV, et pour m'avoir formée quand j'ai mis les pieds pour la première fois dans un labo.

*A toutes les personnes qui ont été impliquées de près ou de loin,*

Merci à la plateforme de cytométrie, Thibault, Seb, Joris, Claudine pour votre disponibilité et conseils, au PBES, notamment Pierre, je te remercie pour toutes les discussions dès 7h du matin et pour ta gentillesse, Caro de la plateforme Vectorologie pour la production de lenti, à tous nos autres collaborateurs notamment Omran pour ta grande aide dans les analyses statistiques, et Fabien pour le modèle mathématique et ta disponibilité.

Enfin, aux membres de mon CST, Laurent et Laurence, vous avez constitué un duo de choc plein de bonnes idées et de conseils avisés.

*Aux souris, aux donneurs sains, aux patients*

*A ceux qui m'ont aidée en me donnant un ou plusieurs conseils, un réactif, une lignée,*

Je pense particulièrement à Sylvain, Pierre-Olivier, David, Isabelle, Elizabeth mais aussi à Ludo, une grosse pensée pour toi ! Merci aussi à Sabrina, Véro, Carine, Elise, Christophe et à toutes les personnes que j'ai pu côtoyer à la Tour, notamment les équipes Thomas Henry/Bénédicte Py dans lesquelles j'ai réalisé mon stage de M2.

*A ma famille et mes amis,*

Tout d'abord au CLAN, Doudou, Jess, Clem, Dr. Marloo, Féfé, Yum, Vanvan, Débow, Mimie, Dr. Karim, Claire et Flo. Merci pour votre soutien tellement important, pour toutes nos sorties et apéros du week end. Je sais que notre amitié continuera encore très longtemps et on se retrouvera au Canada, en France ou en Irlande. Yum, la meilleure des colocos, merci pour ton soutien et ton écoute de tous les jours depuis de nombreuses années, pour avoir respecté mon sommeil tous les matins et tous les soirs, merci d'être ma jumelle ! Pour le diplôme de meilleur des colocos, je peux bien sûr rajouter Ivan. Merci aussi au Club des 8 pour nos années master que

vous avez rendues géniales mais aussi à tous les gamma beta khi pour cette belle amitié. Et pour remonter encore plus dans le temps, merci Artichaut et Elisa pour être mes amis depuis plus de 10 ans! Sans oublier Pauline et Cécile, qui sont passées au labo et qui sont devenues des amies précieuses. Bien sûr je voudrais aussi remercier ma famille et ma belle-famille. Je vous aime et sans vous je n'y serais pas arrivée.

*A mes parents,*

Maman et JP, merci d'être vous et d'autant me soutenir et de m'aider, je pourrais écrire des pages pour vous remercier. Papa, merci pour ces longues heures au téléphone où je te racontais mes aventures au labo et pour t'être beaucoup intéressé à mon métier.

*Enfin, à mon amoureux,*

Merci d'avoir toujours été là, d'avoir écouté toutes mes présentations, d'avoir retenu ce qu'était mTOR, un phosphate, une RMA, une RMA-KR, d'avoir essayé de comprendre le plus petit détail de mon sujet de thèse, d'avoir relu toutes les parties de cette thèse, merci pour mon cube anti-stress et mon ventilateur magique qui m'ont énormément servi pour l'écriture de cette thèse, mais aussi pour toutes les autres étapes de notre vie comme partir en post-doc avec moi sans te poser de questions, et merci d'avance pour toutes les aventures que nous allons encore vivre tous les deux.

*A Nathalie et à Karine.*



# Liste des publications

## Article 1:

**“NK cell-mediated protection against hematologic tumors is limited by functional exhaustion, lack of expansion and poor infiltration of large metastases”**

Marotel M, Drouillard A, Rocca YS, Berton A, Villard M, Mathieu AL, Ainouze M, Hasan U, Walzer T, Marçais A

*En préparation*

## Article 2:

**“NK cells from CHB patients exhibit constitutive pERK, degranulation, impaired mTOR activity and diminished CD16 expression”**

Marotel M, Tout I, Besson L, Pujol M, Ainouze M, Roblot G, Viel S, Loustaud V, Alain S, Gomez M, Allatif O, Walzer T, Marçais A, Hasan U

*En préparation*

## Articles en annexe :

### Article 3:

**“High mTOR activity is a hallmark of reactive natural killer cells and amplifies early signaling through activating receptors”**

Marçais A, Marotel M, Degouve S, Koenig A, Fauteux-Daniel S, Drouillard A, Schlums H, Viel S, Besson L, Allatif O, Bléry M, Vivier E, Bryceson Y, Thauinat O, Walzer T

*Elife 2017*



# Table des matières

<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>14</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>15</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS.....</b>	<b>16</b>
<b>PREMIERE PARTIE : PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>19</b>
<b>1- Les cellules Natural Killer .....</b>	<b>19</b>
1.1 Classification .....	21
1.2 Développement et maturation des cellules NK.....	23
a- Chez la souris.....	23
b- Chez l'homme.....	25
1.3 Migration et circulation des cellules NK.....	27
<b>2- Activation et fonctions des cellules NK.....</b>	<b>29</b>
2.1 Stratégies de reconnaissance de la cible.....	29
a- Théorie de « l'absence du soi » (« missing self ») .....	29
b- Théorie du soi induit (« induced self ») ou du non soi .....	32
c- Signalisation ITAM/ITIM .....	37
d- Flux calcique .....	38
2.2 Fonctions effectrices des cellules NK.....	42
2.2.1 Activation des cellules NK .....	42
a- Lyse naturelle.....	42
b- ADCC : activation dépendante des anticorps.....	42
c- Activation dépendante des cytokines .....	45
2.2.2 Formation de la synapse .....	45
2.2.3 Mécanismes de cytotoxicité.....	49
a- Système perforine/granzyme .....	49
b- Récepteurs de mort.....	52
2.2.4 Production de cytokines.....	53
2.3 Régulation .....	55
2.3.1 Régulation par les cytokines .....	55
2.3.2 Régulation par le CMH de classe I.....	59
2.3.3 Régulation par les métabolites.....	62
<b>3- Rôle protecteur des cellules NK .....</b>	<b>64</b>
3.1 Immunité anti-infectieuse.....	64
3.1.1 Cas des infections aiguës.....	64
3.1.2 Population de NK adaptatives .....	66
3.1.3 Cas des infections chroniques.....	68
3.2 Surveillance anti-tumorale .....	73
3.2.1 Concepts d'immunosurveillance et 3E.....	74
3.2.2 Rôle des cellules NK dans l'immuno-surveillance.....	77
a- Cas des tumeurs primaires solides et hématologiques.....	78
b- Cas des métastases.....	79
<b>4- Échappement à la réponse NK .....</b>	<b>81</b>
4.1 Définition du concept d'épuisement.....	81
4.2 Parallèle avec l'épuisement des LT CD8+ .....	81
4.2.1 Caractéristiques des LT épuisés en contexte infectieux.....	83
4.2.2 Caractéristiques des lymphocytes T épuisés en contexte tumoral.....	91
4.2.3 Causes et mécanismes moteurs de l'épuisement .....	93
4.3 Perte de fonctionnalité des cellules NK.....	103
4.3.1 Observations descriptives de la perte de fonctionnalité des cellules NK .....	103
4.3.2 Caractéristiques des cellules NK non fonctionnelles .....	104
4.3.3 Causes et mécanismes moteurs de la dysfonction des cellules NK .....	111

4.4 Immunothérapies utilisant les cellules NK.....	120
<b>DEUXIEME PARTIE : PARTIE EXPERIMENTALE.....</b>	<b>129</b>
<b>1- Objectifs et hypothèses du travail de thèse.....</b>	<b>129</b>
<b>2- Résultats.....</b>	<b>132</b>
2.1 Génération d'un modèle de lymphome fortement immunogène vis à vis des cellules NK.....	132
2.1.1 Article 1 .....	133
2.1.2 Résultats complémentaires de l'article 1 .....	167
a- Phénotypage des lignées .....	167
b- Données complémentaires de l'article 1 .....	169
c- Comparaison avec le modèle d'injection en sous-cutané.....	171
2.2 Étude des mécanismes impliqués dans la perte de fonction des cellules NK.....	177
2.2.1 Le contrôle exercé par les cellules NK devient progressivement inefficace.....	177
2.2.2 Caractéristiques phénotypiques des cellules NK dans le modèle RMA-KR .....	181
2.2.3 Causes intrinsèques de la perte de fonction.....	183
2.2.4 Causes extrinsèques.....	193
2.2.5 Tentatives de restauration.....	195
2.3 Matériel et méthodes complémentaires.....	198
2.4 Étude clinique d'une cohorte de patients CHB.....	202
2.3.1 Article 2 .....	203
2.3.2 Résultats complémentaires de l'article 2.....	235
a- Nombre de cellules circulantes NK bright et NK dim.....	235
b- Causes possibles de la perte de fonction des cellules NK chez les patients .....	236
c- Matériel et méthodes complémentaires .....	241
<b>3- Discussion .....</b>	<b>243</b>
<b>4- Conclusion et commentaires finaux .....</b>	<b>273</b>
<b>5- Annexes .....</b>	<b>274</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>296</b>

## LISTE DES FIGURES

Figure 1: Les cellules NK appartiennent à l'immunité innée.....	18
Figure 2: Classification et fonction des ILC.....	20
Figure 3: Différenciation et maturation des cellules NK murines.....	22
Figure 4: Les quatre stades de maturation des cellules NK murines.....	22
Figure 5: Différenciation et maturation des cellules NK humaines.....	24
Figure 6: Les deux populations de cellules NK chez l'homme.....	24
Figure 7: Migration et recirculation des cellules NK chez la souris.....	26
Figure 8: Stratégies de reconnaissance de la cible.....	30
Figure 9: Principaux récepteurs des cellules NK.....	35
Figure 10: Chemin d'analyse du répertoire.....	36
Figure 11: Signalisation ITAM/ITIM.....	39
Figure 12: Principales voies de signalisation dans les cellules NK.....	40
Figure 13: Flux calcique dans les cellules NK.....	41
Figure 14: Les différents modes d'activation des cellules NK et les tests fonctionnels utilisés.....	44
Figure 15: Formation de la synapse.....	46
Figure 16: Mécanismes de cytotoxicité.....	50
Figure 17: Signalisation de l'IL-15 et voie mTOR.....	56
Figure 18: Modèles de l'armement et du désarmement.....	60
Figure 19: Phases chroniques de l'infection au VHB.....	70
Figure 20: Concept des 3E.....	76
Figure 21: Réponse T en contexte aigu et chronique.....	82
Figure 22: Caractéristiques des lymphocytes T épuisés.....	84
Figure 23: Hétérogénéité des populations de LT épuisés dans LCMV.....	86
Figure 24: Modèle à 3 signaux de l'épuisement T.....	94
Figure 25: Signalisation des ICP.....	96
Figure 26: Caractéristiques des cellules NK dysfonctionnelles.....	110
Figure 27: Causes et mécanismes moteurs de la perte de fonction NK.....	112
Figure 28: Approches thérapeutiques visant à revigorer les cellules NK.....	121
Figure 29: Génération des 4 lignées.....	131
Figure 30: Comparaison de l'expression de différents ligands entre lignées.....	166
Figure 31: Déplétion tardive des cellules NK dans le modèle RMA-KR.....	168
Figure 32: Fonctionnalité des cellules NK selon la maturation.....	168
Figure 33: La pousse des tumeurs solides RMA-KR est ralentie in vivo.....	170
Figure 34: La formation de tumeur solide RMA-KR est contrôlée par les cellules NK.....	170
Figure 35: Mesure de la pousse tumorale en présence ou absence de cellules NK.....	172
Figure 36: Nombre de cellules NK infiltrant la tumeur dans le modèle s.c et i.v.....	172
Figure 37: Les cellules NK ne subissent pas de conversion en ILC-1 dans notre modèle RMA-KR sc.....	174
Figure 38: Fonctionnalité des cellules NK infiltrant les tumeurs.....	174
Figure 39: Fonctionnalité des cellules NK aux stades terminaux.....	176
Figure 40: Analyse de la fonctionnalité des cellules NK en fonction du nombre de cellules tumorales.....	176

<b>Figure 41: Analyse de la cytotoxicité des cellules NK <i>ex vivo</i></b> .....	178
<b>Figure 42: Survie des souris après injection des 4 lignées</b> .....	178
<b>Figure 43: Expression des NKaR</b> .....	180
<b>Figure 44: Expression combinée des ICP</b> .....	180
<b>Figure 45: Fonctionnalité dans les cellules NK Tim3+ comparées aux Tim3-</b> ..	182
<b>Figure 46: Activation de la voie mTOR</b> .....	182
<b>Figure 47: Signalisation en aval des NKaR</b> .....	184
<b>Figure 48: Formation de conjugués entre les cellules NK et les cellules YAC</b>	186
<b>Figure 49: Analyse des voies de la glycolyse et de l'OXPPOS</b> .....	186
<b>Figure 50: Analyse de marqueurs métaboliques</b> .....	188
<b>Figure 51: Analyse de l'état des mitochondries</b> .....	188
<b>Figure 52: Analyse du profil transcriptionnel au cours du temps</b> .....	190
<b>Figure 53: Analyse GSEA des voies moléculaires dérégulées</b> .....	192
<b>Figure 54: Analyse du taux de TGF-<math>\beta</math> dans la rate de souris porteuses de tumeur</b> .....	194
<b>Figure 55: Transfert adoptif de cellules NK épuisées</b> .....	194
<b>Figure 56: Survie des souris après injection de poly (I:C) ou d'un anti Tim-3</b> .	196
<b>Figure 57: Effet d'un traitement à la Rapamycine</b> .....	196
<b>Figure 58: Nombre de cellules NK et répartition en sous types</b> .....	235
<b>Figure 59: Corrélations entre les paramètres cliniques et la fonction des cellules NK</b> .....	237
<b>Figure 60: Mesure du taux de TNF-<math>\alpha</math> sérique</b> .....	237
<b>Figure 61: Mesure du score IFN</b> .....	239
<b>Figure 62: Analyse de l'import de glucose par les cellules NK</b> .....	239
<b>Figure 63: Comparaison du bilan lipidique</b> .....	240
<b>Figure 64: Analyse du potentiel mitochondrial</b> .....	241
<b>Figure 65: Comparaison des modèles i.v et s.c</b> .....	248
<b>Figure 66: Modèle à 3 signaux de la perte de fonctionnalité des cellules NK</b> ..	263
<b>Figure 67: Fonctionnalité des cellules NK en fonction du niveau d'activité de mTOR</b> .....	265
<b>Figure 68: Modèle à 2 mécanismes de la perte de fonction NK chez les patients CHB</b> .....	272

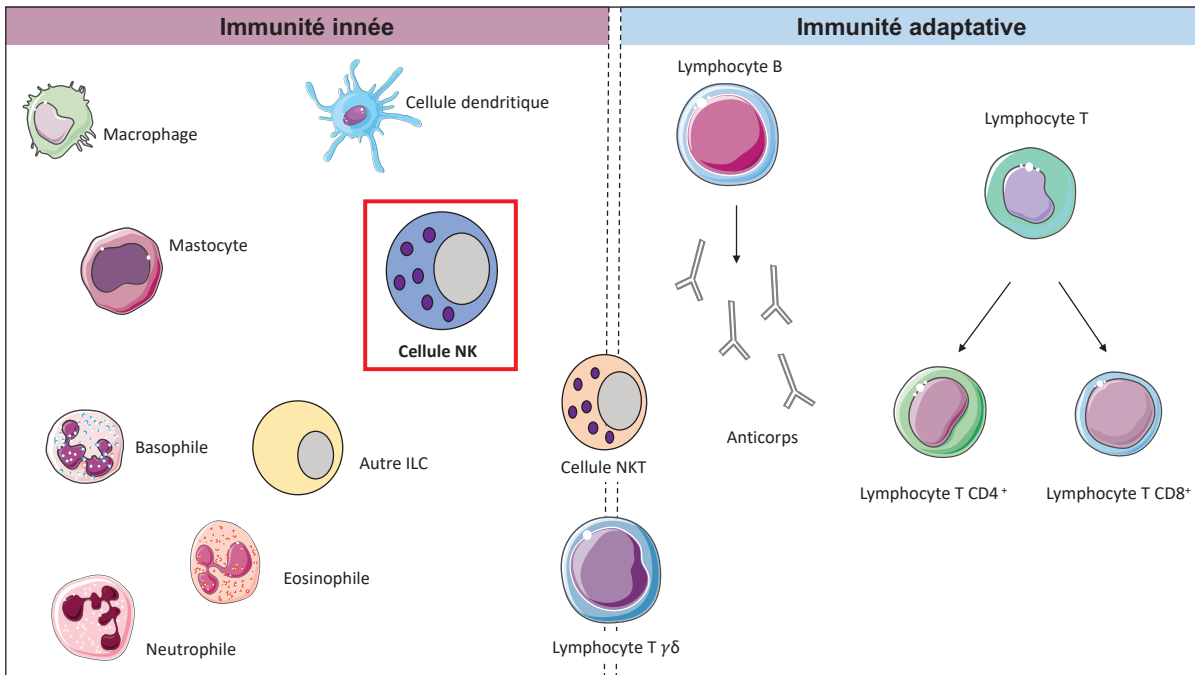
## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1: Principales études sur les cellules NK et l'Hépatite B aiguë</b> .....	71
<b>Tableau 2: Principales études sur les cellules NK et l'Hépatite B chronique</b> .....	73
<b>Tableau 3: Principales études concernant la perte de fonctionnalité des cellules NK chez la souris</b> .....	103
<b>Tableau 4: Anticorps utilisés</b> .....	201
<b>Tableau 5: Comparaison des principales données concernant le métabolisme des LTCD8+ épuisées et les cellules NK du modèle RMA-KR</b> .....	256

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADCC :	Antibody dependent cellular cytotoxicity
AICL :	Activation-induced C-type Lectin
AML :	Leucémie aigüe myéloblastique
AMPK:	AMP activated Kinase
Bak :	Bcl2 homologous antagonist killer
Bax :	Bcl2 associated protein X
BCR :	B cell receptor
BID :	BH3 interacting domain
CAR :	Chimeric antigen receptor
CD :	Cluster of differentiation
CLP :	Commun lymphoïd progenitor
CMH :	Complexe majeur d'histocompatibilité
CMP :	Commun myeloïd progenitor
CRISPR :	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CRS :	Cytokine release syndrome
CRS :	Cytokine release syndrome
CSH :	Cellule souche hématopoïétique
CTLA-4 :	Cytotoxic T lymphocyte associated protein 4
DAMP :	Damage-associated molecular patterns
DAP:	DNAX activating protein
DC:	Dendritic cells
DNAM-1 :	DNAX accessory molecule-1
Erk :	Extracellular signal regulated kinase
FADD :	Fas-Associated protein with Death Domain
GM-CSF :	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
GSEA :	Gene set enrichment analysis
GvHd :	Graft versus host disease
GzmB :	Granzyme B
HA :	Hémagglutine virale
HCMV :	Human cytomegalovirus
HLA :	Human leukocyte antigen
ICD :	Induced cell death
IFN :	Interféron
Ig :	Immunoglobuline
IL :	Interleukine
ILC :	Cellules lymphoïdes innées (Innate lymphoid cells)
iNOS :	Oxyde nitrique synthase
ISG :	Interferon stimulated gene
ITAM :	Immunoreceptor tyrosine based activation
ITIM :	Immunoreceptor tyrosine based inhibition
KLRG1 :	Killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1
KO :	Knock out
Kpb :	Kilos paires de bases
Lag-3 :	Lymphocyte-activation gene 3
LB :	Lymphocyte B
LCMV :	virus de la chorioméningite lymphocytaire
LFA-1:	Lymphocyte function associated antigen 1
LT:	Lymphocyte T
mAb :	Monoclonal antibody
MCA :	Methylcholanthrene induced carcinogenesis
MCVM :	Mouse cytomegalovirus
MDSC :	Myeloïd derived suppressive cells
MICA/B :	MHC Class I chain-related protein A and B

MIP :	Macrophage inflammatory protein
MMP:	Matrix Métalloproteinase
MTOC:	Microtubule organizing center
mTOR :	Mammalian target of rapamycin
MULT1 :	Murine UL16 binding protein-like transcript
NCAM :	Neural Cell Adhesion Molecule
NK :	Natural Killer
NKaR :	NK cell activating receptor
NKG2D :	NK receptor group 2, member D
NKiR :	NK cell inhibitory receptor
PD-1 :	Programmed cell death 1
Perf:	Perforine
PI3K :	Phosphoinositide 3 Kinase
PLCy :	Phospholipase C gamma
PLZF :	Promyelocytic leukaemia zinc finger
Rae1 :	Retinoic acid early inducible 1
Rag :	Recombination activating gene
RANTES :	Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed, and Secreted
Raptor :	Regulatory associated protein of mTOR
REDD-1:	Regulated during development and DNA damage responses 1
Rictor :	Rapamycine insensitive companion of mTOR
ROS :	Reactive oxygen species
S1P :	Sphingosine-1 phosphate
S1P5 :	Sphingosine-1 phosphate receptor 5
SCID :	Severe combined immunodeficiency
SLAM :	Signaling lymphocyte activation molecule
T eff :	LT effecteurs
T exh :	LT épuisés
T mém :	LT mémoires
TCR :	T cell receptor
TEM :	Tumor microenvironment
TFs :	Transcription factors
TGF:	Transforming growth factor
Th :	T helper
TIGIT :	T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains
Tim-3 :	T-cell immunoglobulin and mucin domain 3
TMRM :	Tetramethylrhodamine methyl ester perchlorate
TNF :	Tumor Necrosis Factor
Tox :	thymocyte selection associated high mobility group
TRAIL:	TNF related apoptosis inducing ligands
Treg :	Lymphocytes T régulateurs
TSC :	Tuberous sclerosis complex
ULBP:	UL 16 Binding protein
VHB :	Virus de l'Hépatite B
VHC :	Virus de l'Hépatite C
VIH :	Virus de l'immunodéficience humaine
WASP :	Wiskott Aldrich Protein



*Adapté d'Alberti, 2012*

**Figure 1: Les cellules NK appartiennent à l'immunité innée**

Les cellules NK sont classiquement présentées comme l'équivalent inné des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques qui appartiennent au compartiment adaptatif. Les cellules immunitaires adaptatives se distinguent des cellules innées car elles expriment des récepteurs spécifiques d'un antigène particulier générés par recombinaison génique. A l'inverse, les cellules innées expriment des récepteurs codés par la lignée germinale.

# PREMIERE PARTIE : PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

## 1- Les cellules Natural Killer





C'est en 1975 que les chercheurs Kiessling et Herberman avec leurs collègues découvrent une population de cellules lymphocytaires ayant la capacité de lyser *in vitro* de manière rapide et spontanée des cellules anormales de type tumoral sans l'intervention d'une cellule présentatrice d'antigène (Herberman et al., 1975; Kiessling et al., 1975a, 1975b). Cependant, ces cellules n'exprimaient pas les marqueurs des lymphocytes T (LT) ou B (LB) connus à l'époque ; Kiessling et Herberman définissent alors une troisième classe de grands lymphocytes granuleux (ni B ni T) : les lymphocytes Natural Killer (NK) (Figure 1).

Les lignées tumorales cibles utilisées dans ces études pionnières sont les cellules YAC-1 (cellules infectées par le virus de la leucémie murine Moloney) ou les cellules K562 (cellules humaines leucémiques). Ces lignées cellulaires restent à ce jour, encore employées dans les laboratoires pour activer les cellules NK et mesurer leur activité cytotoxique.

Phénotypiquement, les cellules NK sont définies chez l'homme comme des lymphocytes négatifs pour CD3 (caractérisant le complexe TCR) et exprimant CD56 / NCAM (pour « Neural Cell Adhesion Molecule ») (Lanier et al., 1986). CD56 étant également présent à la surface d'un faible pourcentage de lymphocytes T (lymphocyte NKT), l'absence de CD3 est un critère nécessaire à l'identification des cellules NK.

Chez la souris C57BL/6, l'identification des cellules NK se fait grâce à l'anticorps PK136 qui reconnaît l'épitope NK1.1 sur le récepteur activateur NKR-P1C. Les cellules NK sont donc identifiées de la manière suivante : NK1.1<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup> (Hackett et al., 1986). L'intégrine CD49b (reconnue par l'anticorps DX5) et le récepteur à l'interleukine (IL)-15 (CD122) peuvent également être utilisés et servent à l'identification des cellules NK dans les souches murines NK1.1<sup>-</sup> (Di Santo, 2006).



Stimuli	Groupe	Médiateurs	Facteur de Transcription	Fonctions immunitaires
<b>Tumeurs, microbes intracellulaire</b> (virus, bactéries, parasites)	Groupe 1 	IFN- $\gamma$ Granzymes Perforine	T-bet	Immunité de type I (activation des macrophages, cytotoxicité)
<b>Parasites extracellulaires larges et allergènes</b>	Groupe 2 	IL-4 IL-5 IL-9 IL-13	GATA 3	Immunité de type II (activation alternative des macrophages)
<b>Organisateurs mésenchymateux</b>	Groupe 3 	RANK L Lymphotoxine TNF IL-17, IL-22	ROR $\gamma$ t	Formation de structures lymphoïdes secondaires
<b>Microbes extracellulaires</b> (bactéries, champignons)		IL-17 IL-22 GM-CSF Lymphotoxine		Immunité de type III (Phagocytose, peptides antimicrobien)

Adapté de Spits et al., 2013

### Figure 2: Classification et fonction des ILC

La classification des ILC se base sur leurs caractéristiques fonctionnelles et notamment sur le type de cytokines qu'elles produisent. Le groupe 1 (ILC1 et cellules NK), sont capables de produire des cytokines de type Th1 (IFN $\gamma$  notamment). Les ILC2 produisent des cytokines de type Th2 (IL-4, IL-5, IL-9, IL-13) et le groupe 3 composé des LTi et des ILC3 sécrète des cytokines de type Th17 (IL-17 et IL-22).

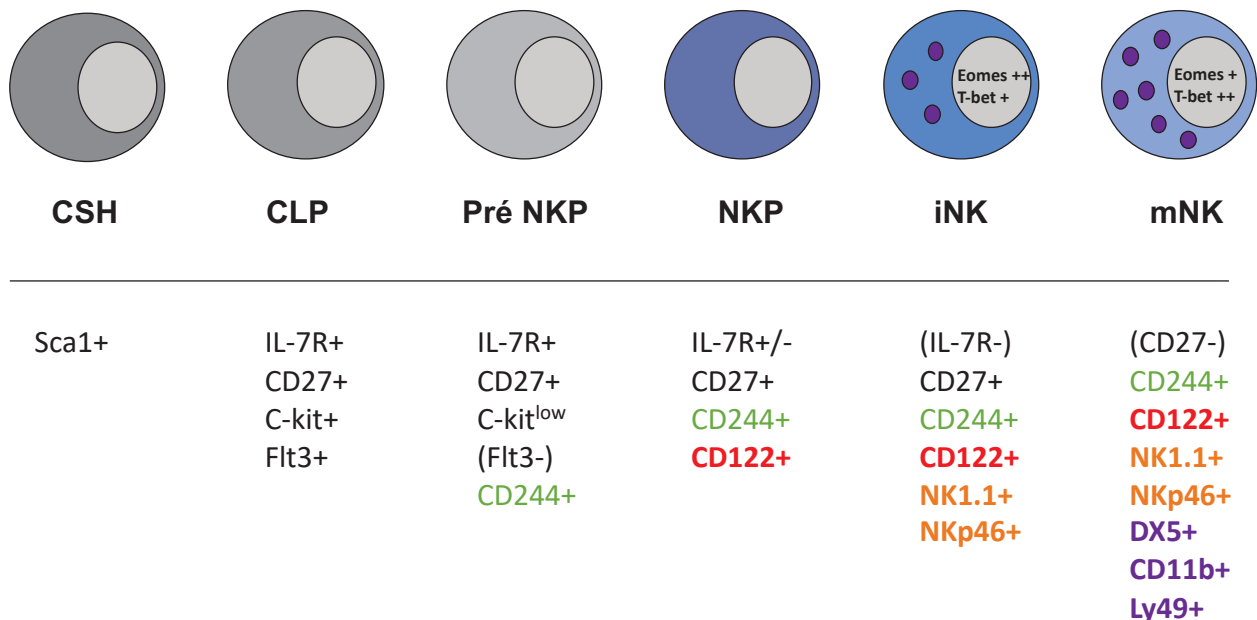
Plus récemment, il a été montré que les cellules NK des souches de souris les plus couramment utilisées en laboratoire expriment le récepteur NKp46 (Walzer et al., 2007a). Il est important de noter qu'aucun de ces marqueurs pris isolément ne permet une identification univoque de la population NK (NK1.1 est aussi exprimé par certaines cellules NKT, NKp46 par les cellules lymphoïdes innées de type 1 (ILC1) et certaines de type 3 (ILC3)).

Leur rôle dans l'immunité innée et leur implication essentielle pour l'élimination des cellules infectées et tumorales ont été bien caractérisés depuis leur découverte. Depuis quelques années, on cherche maintenant à cibler cette population en vue de développer de nouvelles immunothérapies utilisant les cellules NK.

## 1.1 Classification

Le compartiment lymphoïde inné ne se compose pas uniquement de cellules NK. En effet, d'autres sous-populations ont été découvertes une vingtaine d'années plus tard. Tout comme les cellules NK, elles n'expriment pas de récepteur spécifique d'antigène issu de la recombinaison génique, particularité du système adaptatif. Sur la base de critères fonctionnels, ces cellules lymphoïdes innées (ILC) ont été regroupées en trois ensembles, en empruntant la nomenclature des lymphocytes T auxiliaires (Th) (**Figure 2**) (revue de Spits et al., 2013; Vivier et al., 2018).

Le groupe ILC1 est composé de deux sous populations : les ILC1 qui produisent des cytokines de type Th1 (interféron (IFN)- $\gamma$ ) et les cellules NK qui sont classiquement présentées comme l'équivalent inné des LT CD8+ cytotoxiques de par leur caractéristiques proches (production d'IFN- $\gamma$  et forte cytotoxicité). Le groupe ILC2 sécrète des cytokines de type Th2 (IL-5 et IL-13 majoritairement) et enfin le groupe ILC3 regroupe des populations hétérogènes dont les LT<sub>i</sub> (lymphoid tissue inducer) et produit des cytokines de type Th17/Th22 (IL-17 et/ou IL-22).

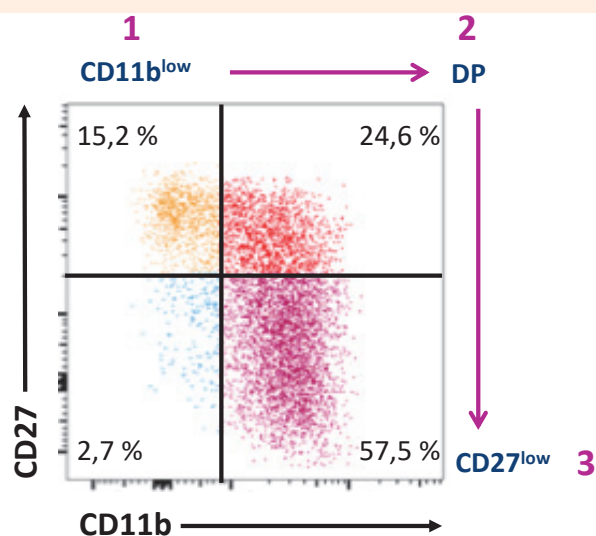


Adapté de Geiger and Sun, 2016

### Figure 3: Différenciation et maturation des cellules NK murines

Les cellules NK se développent dans la moelle osseuse à partir d'un précurseur provenant du progéniteur lymphoïde commun. Suite à l'acquisition de la chaîne  $\beta$  du récepteur à l'IL-15 (CD122) essentiel à leur prolifération, elles rentrent dans un processus de maturation séquentielle gouverné par les facteurs de transcription T-Bet et Eomes. L'expression de NK1.1 marque leur engagement dans le lignage NK.

M.Marotel (Equipe T.Walzer)



### Figure 4: Les quatre stades de maturation des cellules NK murines

Le processus de maturation terminal des cellules NK se fait en trois étapes à partir du stade immature  $CD11b^{low}$ . Dans la rate, les  $CD11b^{low}$  représentent environ 10-15% des cellules NK. Le deuxième stade de maturation (environ 30%) est le stade double positif (DP) où les cellules expriment  $CD11b$  et  $CD27$ . Enfin, le dernier stade qui est le plus représenté en périphérie à raison d'environ 60% des cellules NK spléniques est le stade mature, caractérisé par l'expression de  $CD11b$  ( $CD27^{low}$ ).

Une autre similarité avec les lymphocytes T auxiliaires est l'expression de facteurs de transcription communs avec les sous-populations de LT et essentiels à leur développement : T-bet pour le groupe ILC1, GATA3 pour le groupe ILC2 et ROR $\gamma$ t pour le groupe ILC3. Enfin, à l'exception des cellules NK, ces populations d'ILC résident majoritairement hors des organes lymphoïdes primaires et secondaires.

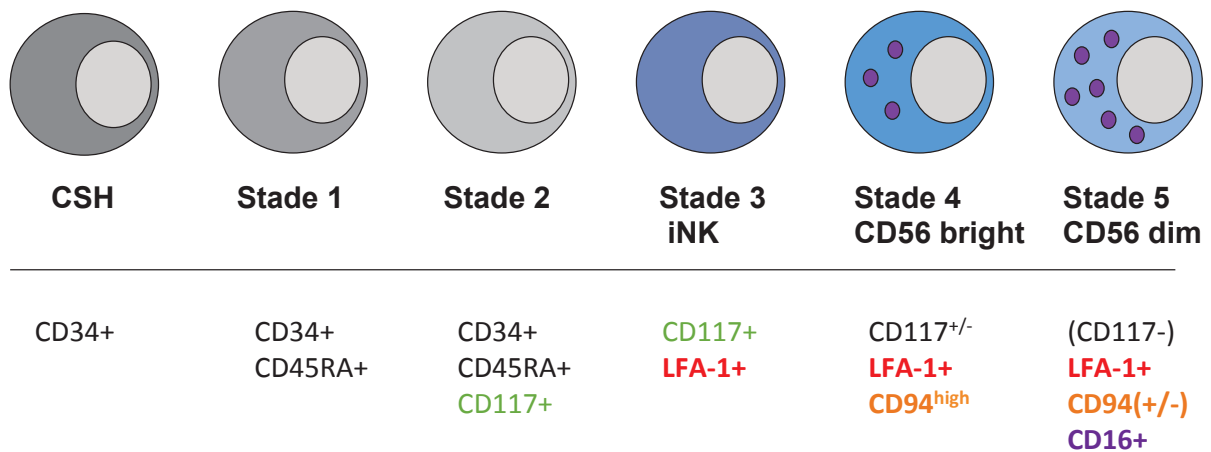
## 1.2 Développement et maturation des cellules NK

Le site principal de développement des cellules NK est la moelle osseuse. En effet, il a été montré que leur génération et leur maintien nécessitent une moelle osseuse intègre (Haller and Wigzell, 1977).

### a- Chez la souris

Les cellules NK sont issues d'une cellule souche hématopoïétique (CSH). Cette CSH va donner naissance à deux types de progéniteurs : le progéniteur myéloïde commun (CMP), capable de produire toutes les cellules myéloïdes et le progéniteur lymphoïde commun (CLP) (Kondo et al., 1997), capable de générer tous les sous types de lymphocytes.

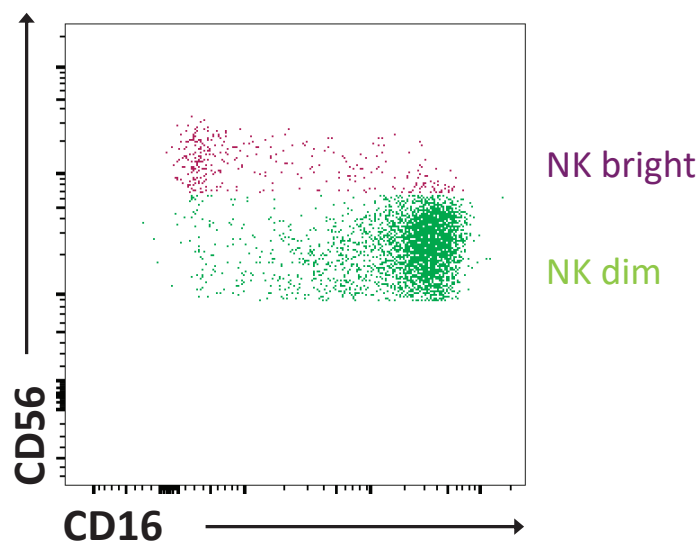
Le CLP est caractérisé par l'absence de marqueur de lignage (CD3<sup>-</sup>, CD4<sup>-</sup>, CD8<sup>-</sup>, CD19<sup>-</sup>, Ter119<sup>-</sup>, Gr1<sup>-</sup>, NK1.1<sup>-</sup>) et par l'expression de « Stem cell antigen I » (Sca-1), CD127 (IL-7R $\alpha$ ), et des récepteurs aux facteurs de croissance CD117 (c-kit) et CD135 (Flt3) (revue de Geiger and Sun, 2016) (Figure 3). L'entrée dans le lignage NK se fait ensuite via le progéniteur NK (NKP) lui-même précédé par la cellule pré-NKP définie comme lin<sup>-</sup>, c-kit<sup>low</sup>, Flt3<sup>-</sup>, CD127<sup>+</sup>, et CD244<sup>+</sup> (2B4<sup>+</sup>). Le progéniteur NKP est lui identifié par l'expression de la chaîne  $\beta$  du récepteur à l'IL-15 (CD122) et n'exprime pas les marqueurs NK (Rosmaraki et al., 2001). Puis, le progéniteur NKP acquiert l'expression de NK1.1, NKp46 et TRAIL et s'ensuit un processus de maturation en trois étapes (Figure 4). La définition des trois stades de maturation est basée sur l'expression de l'intégrine **CD11b** et de **CD27**, un récepteur de la famille



Adapté de Yu et al., 2013

### Figure 5: Différenciation et maturation des cellules NK humaines

A partir de la cellule souche hématopoïétique, les cellules NK humaines se différencient en cinq stades et donnent naissance aux deux populations CD56<sup>bright</sup> et CD56<sup>dim</sup>.



M. Marotel (Equipe T. Walzer)

### Figure 6: Les deux populations de cellules NK chez l'homme

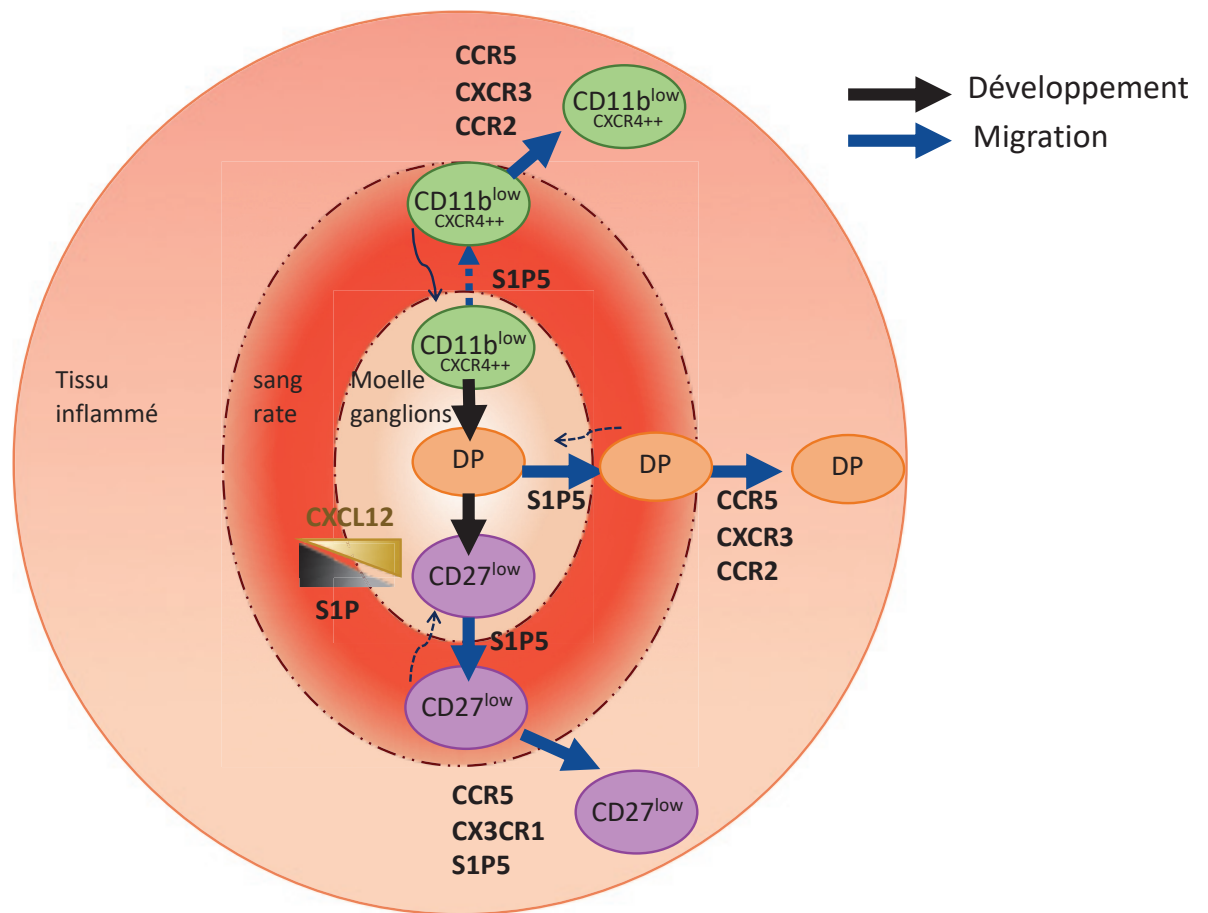
Les CD56<sup>bright</sup> représentent environ 10% des cellules NK du sang, elles expriment fortement CD56 mais n'expriment pas CD16. Leur capacité à produire des cytokines est plus importante. A l'inverse, les CD56<sup>dim</sup> expriment plus faiblement CD56, mais expriment fortement CD16. Elles ont un potentiel cytotoxique plus élevé et représentent 90% des cellules NK du sang.

des récepteurs TNF (« Tumoral Necrosis Factor ») (Boos et al., 2008). Le stade le plus immature (iNK, CD11b faible (low)) est caractérisé par l'expression de CD27 et l'absence d'expression de CD11b. Cette sous-population NK est surtout présente au niveau de la moelle osseuse et des ganglions. Le stade suivant est le stade double positif (DP) où les cellules expriment CD27 et CD11b. Puis, le troisième et dernier stade de maturation (mNK, CD27<sup>low</sup>), auquel les cellules NK ont perdu l'expression de CD27 mais expriment CD11b (Chiossone et al., 2009). Ces dernières cellules sont majoritairement retrouvées en périphérie (rate, sang, foie, poumon).

Le développement et la maturation des cellules NK sont également sous le contrôle de deux facteurs de transcription (TFs) appartenant à la famille T-Box, T-bet (codé par *Tbx21*) et Eomesodermine (codé par *Eomes*) (revue de Zhang et al., 2018a). L'expression de ces deux TFs est acquise lorsque les cellules progressent vers le stade immature mais l'expression de T-bet reste faible dans les cellules immatures au niveau de la moelle osseuse (Daussy et al., 2014). Il est ensuite fortement exprimé et contrôle la maturation terminale des cellules NK probablement par l'induction d'un autre facteur de transcription, Zeb-2 (van Helden et al., 2015). De plus, T-bet réprime l'expression d'Eomes (Zhang et al., 2018a).

## **b- Chez l'homme**

Les cellules NK humaines se développent également dans la moelle et dérivent d'une cellule souche hématopoïétique CD34<sup>+</sup> (Miller et al., 1992). L'existence d'un CLP donnant naissance au lignage T, B et NK a ensuite été découverte (Galy et al., 1995). Le développement des NK à partir du CLP peut ensuite être décomposé en cinq stades (Freud and Caligiuri, 2006) (**Figure 5**). Le stade 2 correspond au stade précurseur NK qui exprime CD117, le récepteur au facteur de croissance SCF (Stem Cell Growth Factor). Puis, le stade 3 définit les NK immatures LFA1<sup>+</sup> qui vont ensuite produire deux populations retrouvées chez l'homme et identifiées par le niveau d'expression du marqueur CD56 : les CD56<sup>bright</sup> et les CD56<sup>dim</sup> (Cooper et al., 2001a; Yu et al., 2013), « bright » pour brillant et « dim » pour faible (**Figure 6**). A cette étape, les cellules NK commencent à exprimer le récepteur CD94 qui peut s'associer



Adapté de Vivier et al., 2008

### Figure 7: Migration et recirculation des cellules NK chez la souris

Les gradients de S1P et de CXCL12 s'opposent au niveau de la moelle osseuse permettant ainsi le maintien du pool de CD11b<sup>low</sup> (exprimant fortement CXCR4) dans la moelle et la migration des cellules NK matures exprimant plus fortement S1P5 vers la périphérie. En conditions inflammatoires, les cellules NK vont être recrutées au niveau des tissus via la mise en jeu d'autres récepteurs aux chimiokines CCR5, CXCR3 et CCR2.

sous forme d'hétéro-dimère avec les récepteurs NKG2C (activateur) ou NKG2A (inhibiteur). Le fait que le stade bright précède le stade dim fut longuement débattu et ces deux sous-types diffèrent sur plusieurs points. Tout d'abord, leur répartition dans le sang n'est pas la même. En effet, on trouve environ 90% de NK CD56<sup>dim</sup> et 10% de NK CD56<sup>bright</sup>. Les cellules CD56<sup>dim</sup> présentent une forte granulosité alors que les cellules CD56<sup>bright</sup> sont peu granuleuses. Une autre différence est que les cellules CD56<sup>dim</sup> à l'inverse des cellules bright, expriment le récepteur CD16 (Figure 6). Enfin, il est admis dans la littérature que les cellules NK CD56<sup>dim</sup> ont de meilleures fonctions cytotoxiques alors que les CD56<sup>bright</sup> sont capables de sécréter de plus grandes quantité de cytokines (Cooper et al., 2001b; Jacobs et al., 2001). Les cellules CD56<sup>bright</sup> répondent mieux aux cytokines IL-2/12/18 comparées aux CD56<sup>dim</sup> (Cooper et al., 2001b). La maturation des cellules NK humaines est également contrôlée par T-bet et Eomes et les cellules matures expriment fortement les deux TFs (Zhang et al., 2018a).

Une récente analyse, par séquençage des ARN sur cellule unique (single cell RNA Sequencing) des cellules NK murines et humaines, a permis de démontrer que les deux sous-groupes majeurs murins CD27<sup>low</sup> (matures) et CD11b<sup>low</sup> (immatures), nommés respectivement NK1 et NK2 présentent une signature transcriptionnelle similaire à leurs homologues humains CD56<sup>dim</sup> (matures) et CD56<sup>bright</sup> (immatures), suggérant un lien de différenciation allant de CD56<sup>bright</sup> à CD56<sup>dim</sup> (Crinier et al., 2018).

### 1.3 Migration et circulation des cellules NK

Après leur maturation dans la moelle osseuse, les cellules NK vont se relocaliser en périphérie dans les organes lymphoïdes et non lymphoïdes (Figure 7). En condition physiologique, ce processus de migration dépend essentiellement de deux récepteurs : S1P5 (Sphingosine-1 phosphate receptor 5) (Walzer et al., 2007b) et CXCR4 (Mayol et al., 2011). L'expression du récepteur S1P5 augmente au cours de la maturation et suit l'expression de CD11b et la perte de CD27 alors que celle de CXCR4 diminue au cours de la maturation. S1P5 reconnaît le médiateur lipidique



S1P qui, une fois sécrété, peut lier les protéines du plasma et influencer la migration, la prolifération, l'adhésion et la morphogénèse des lymphocytes. En effet, il existe un gradient de S1P ; les concentrations étant plus élevées dans le sang et la lymphe et plus faibles dans les tissus. Ce gradient permet ainsi la sortie des cellules NK de la moelle, une fois matures. Le gradient de CXCL12 est quant à lui, inverse. Cette chimiokine, reconnue par CXCR4, est en effet sécrétée par les cellules stromales au niveau de la moelle osseuse (Tokoyoda et al., 2004), et va donc permettre la rétention des cellules NK CXCR4<sup>+</sup> immatures au site de maturation.

Concernant la distribution anatomique des cellules NK, celles-ci sont localisées principalement dans les organes lymphoïdes secondaires et la circulation sanguine. Chez la souris, la rate est l'organe comptant le plus de cellules NK (2 à 3 millions) ce qui représente environ 2 à 5% des splénocytes (Grégoire et al., 2007). Elles se localisent au niveau de la pulpe rouge c'est-à-dire qu'elles sont exclues des zones T et B. Cependant, la fréquence de cellules NK parmi les lymphocytes est plus importante dans certains organes non lymphoïdes. Elle peut ainsi s'élever à 10% dans les poumons et 30% dans le foie chez la souris (Grégoire et al., 2007). Chez l'homme, elles comptent pour environ 10% des lymphocytes du sang et se localisent également dans les organes lymphoïdes secondaires tels que les ganglions et les amygdales. Leur renouvellement nécessite environ deux semaines (17 jours) (Jamieson et al., 2004).

Les cellules NK vont pouvoir être recrutées au site d'inflammation via l'expression d'autres récepteurs de chimiotaxisme tels que CCR2, CCR5, CXCR3 et CX3CR1 permettant de répondre à un large panel de chimiokines : CCL2, 3, 5, 7, 8, 9, 11, 13 ainsi qu'à CXCL9/11 et CX3CL1 (Grégoire et al., 2008). Enfin, CD62L (L-selectin) permet le recrutement et l'entrée des cellules NK dans les ganglions (Chen et al., 2005).

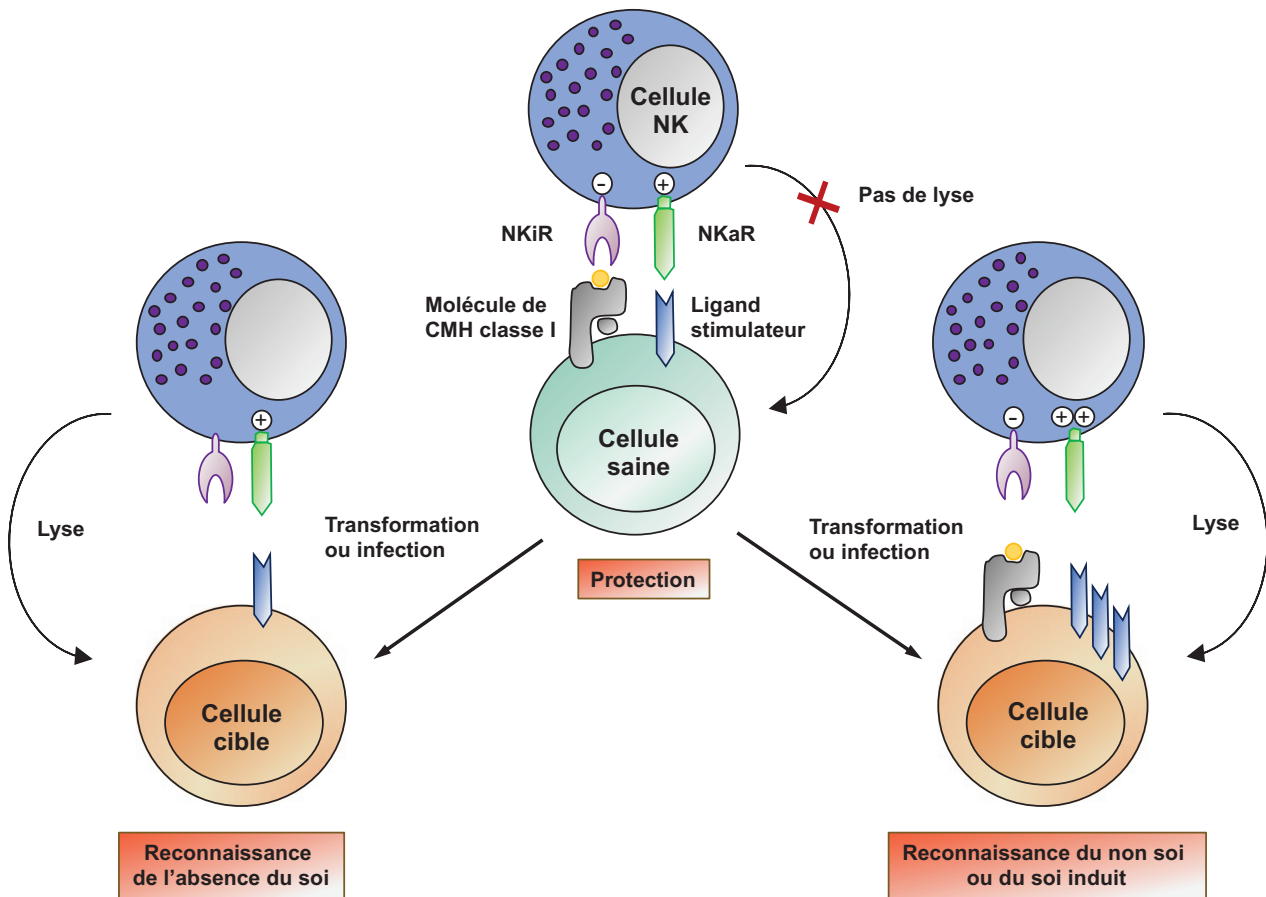
## 2- Activation et fonctions des cellules NK

### 2.1 Stratégies de reconnaissance de la cible

Le rôle principal des cellules NK, comme leur nom l'indique, est de détruire les cellules anormales infectieuses ou tumorales. Pour cela, elles sont équipées d'une multitude de récepteurs activateurs ou inhibiteurs qui vont intégrer respectivement des signaux positifs ou négatifs. Cela leur permet de répondre à un grand nombre de stimuli et donc de situations. Ainsi, leur activité cytotoxique est le résultat de la balance entre les signaux délivrés par les récepteurs inhibiteurs et activateurs. En contexte physiologique, les signaux délivrés par les récepteurs inhibiteurs dominent ceux des récepteurs activateurs empêchant ainsi les cellules NK de s'attaquer aux cellules du soi.

#### a- Théorie de « l'absence du soi » (« missing self »)

A l'inverse des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques, les cellules NK reconnaissent **le soi manquant** (Figure 8). Cette reconnaissance se fait via les récepteurs inhibiteurs qui lient les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I), c'est la théorie du « *missing self* ». En effet, l'ensemble des cellules nucléées d'un organisme (à l'exception des cellules germinales) exprime des molécules de CMH-I à leur surface. Ces cellules inhibent ainsi les fonctions des cellules NK en interagissant avec les récepteurs inhibiteurs. En revanche, les cellules transformées ou infectées ont tendance à perdre l'expression des molécules de classe I afin d'échapper à la réponse conduite par les LT CD8<sup>+</sup> cytotoxiques. Cette perte du CMH-I induit la perte du signal inhibiteur et l'induction des fonctions effectrices des cellules NK. Ce sont les travaux de Kärre et Ljunggren qui ont permis de révéler la capacité des cellules NK à lyser préférentiellement les cellules tumorales dont l'expression des molécules du CMH I était diminuée (Kärre et al., 1986). Plusieurs familles de récepteurs inhibiteurs (NKiR) spécifiques du CMH de classe I existent et toutes ne sont pas conservées entre espèces :



Adapté de Raulet and Vance, 2006

### Figure 8: Stratégies de reconnaissance de la cible

La reconnaissance de la cible par les cellules NK met en jeu deux types de mécanismes : la reconnaissance de l'absence du soi et la reconnaissance du non soi ou du soi induit. En contexte physiologique, les cellules saines expriment les molécules du CMH-I reconnues par les récepteurs inhibiteurs à la surface des cellules NK et délivrent ainsi des signaux inhibiteurs. En cas d'absence de CMH-I à la surface des cellules cibles, les récepteurs inhibiteurs ne reçoivent pas de signal et la balance est donc en faveur des signaux activateurs. La cellule NK s'active et lyse la cellule cible. En plus de diminuer l'expression du CMH-I, les cellules tumorales ou infectées peuvent exprimer des ligands des récepteurs activateurs naturellement très peu exprimés en condition physiologique (appartenant au non soi ou au soi induit par un stress). La balance est donc en faveur des signaux activateurs, ce qui conduit à l'activation de la cellule NK et à la lyse de la cible.

- *Récepteurs Ly49 (lectines de type C) : retrouvés chez la souris*

Le premier récepteur de ce type à avoir été mis en évidence est Ly49A dans une étude où les auteurs ont démontré son implication dans la théorie du « missing self » (Karlhofer et al., 1992). Les récepteurs Ly49 sont des glycoprotéines transmembranaires de type II qui vont avoir différents ligands : molécules du CMH-I ou similaires au CMH (« CMH-I-like »). Leurs gènes, au nombre de 14, sont codés au niveau du complexe NK sur le chromosome 6 chez la souris. Ils sont absents chez l'homme.

- *Récepteurs KIR (superfamille des immunoglobulines (Ig)) : retrouvés chez l'homme*

Ce sont des glycoprotéines transmembranaires de type I. Bien que ces récepteurs ne soient pas reliés évolutivement aux récepteurs Ly49, ce sont des équivalents fonctionnels et ils présentent tout de même de nombreuses similarités avec ces derniers. Ils reconnaissent ainsi les molécules du CMH-I HLA A, B et C (HLA pour « human leukocyte antigen »). La localisation de leurs gènes est très proche dans le génome, au niveau du chromosome 19q13.4. La nomenclature désignant ces récepteurs est basée sur leur conformation. Ils possèdent deux (KIR2D) ou trois (KIR3D) domaines de type Ig dans leur région extracellulaire. La longueur de leur partie intra cellulaire est variable : certains possèdent un domaine intra cytoplasmique long (L) comportant un ou deux motifs ITIM alors que d'autres récepteurs ont un domaine court (S) ne comportant pas de motif ITIM mais une région permettant l'association à la protéine adaptatrice DAP12. Ces derniers KIR sont de ce fait des récepteurs activateurs.

- *Hétéro-dimère NKG2A/CD94 : partagé par les deux espèces*

NKG2A, récepteur de la famille des lectines C, forme un hétéro-dimère avec la chaîne invariante CD94 et reconnaît son ligand HLA-E chez l'homme et Qa1b chez la souris. Cet hétéro-dimère va ensuite s'associer à la protéine adaptatrice DAP12.

Enfin, les cellules NK expriment d'autres NKiR non spécifiques du CMH de classe I comme par exemple KLRG1 (Killer cell lectin like receptor subfamily G member 1).

Ce récepteur de la famille des lectines de type C a été identifié de par la localisation de son gène au niveau du complexe NK et par la présence d'un motif ITIM dans sa partie intra cytoplasmique (Butcher et al., 1998). Il est généralement considéré comme un marqueur de différenciation terminale car exprimé par les LTCD8<sup>+</sup> effecteurs, les cellules T mémoires et les cellules NK les plus matures. KLRG1 a pour ligands les E, N et R cadhérines.

Nous verrons plus tard qu'il existe un autre type de récepteur inhibiteur dont l'expression est transitoire et fait suite à l'activation. Cette classe de récepteur se nomme « points de contrôle immunitaires » ou ICP (pour « immune checkpoints »).

### **b- Théorie du soi induit (« induced self ») ou du non soi**

A l'opposé, les signaux activateurs proviennent de la liaison entre les récepteurs activateurs (NKaR) et des ligands de stress naturellement peu exprimés en condition physiologique mais dont l'expression peut être fortement augmentée par un stress (soi induit) comme une infection microbienne, le processus de transformation tumorale ou des altérations physico-chimiques pouvant activer la réponse aux dommages de l'ADN (Raulet and Guerra, 2009) (Figure 8). De plus, des **molécules du non soi** peuvent également être reconnues par les cellules NK à la surface de cellules infectées par des pathogènes (Horowitz et al., 2012). Certains auteurs s'accordent pour dire que l'engagement d'au moins deux récepteurs activateurs est nécessaire pour activer une cellule NK car ces récepteurs semblent agir en synergie (Bryceson et al., 2006).

Les principaux NKaR englobent les récepteurs de cytotoxicité naturelle (NCR), NKG2D, DNAM-1 et CD16.

- **NCR**

Les premiers récepteurs de cytotoxicité naturelle à avoir été découverts sont NKp46 (Sivori et al., 1997), NKp44 (Cantoni et al., 1999) et NKp30 (Pende et al., 1999).

NKp46 fut longuement considéré comme le marqueur exclusif des cellules NK (Moretta et al., 2001a; Walzer et al., 2007a) ; mais Reynders *et al.*, ont démontré en 2011 que son expression est également partagée par certaines ILC-3 (Reynders et al., 2011). NKp46 et NKp30 présentent de nombreuses similarités, ils utilisent la protéine adaptatrice CD3 $\zeta$  et sont tous deux exprimés sur les cellules NK à l'état de base. NKp44 en revanche nécessite une activation préalable via la cytokine IL-2 et s'associe à une autre protéine adaptatrice, DAP12 pour DNAX activating protein 12. Seul NKp46 est présent chez la souris. Les ligands de ces 3 NCR demeurent non déterminés à l'exception de l'hémagglutinine virale (HA, protéine de surface du virus de la grippe) qui peut lier NKp44 et NKp46 (Arnon et al., 2001; Mandelboim et al., 2001), et de B7H6 (ligands présents à la surface de certaines cellules tumorales) qui est le seul ligand identifié pour NKp30 (Brandt et al., 2009).

- ***NKG2D***

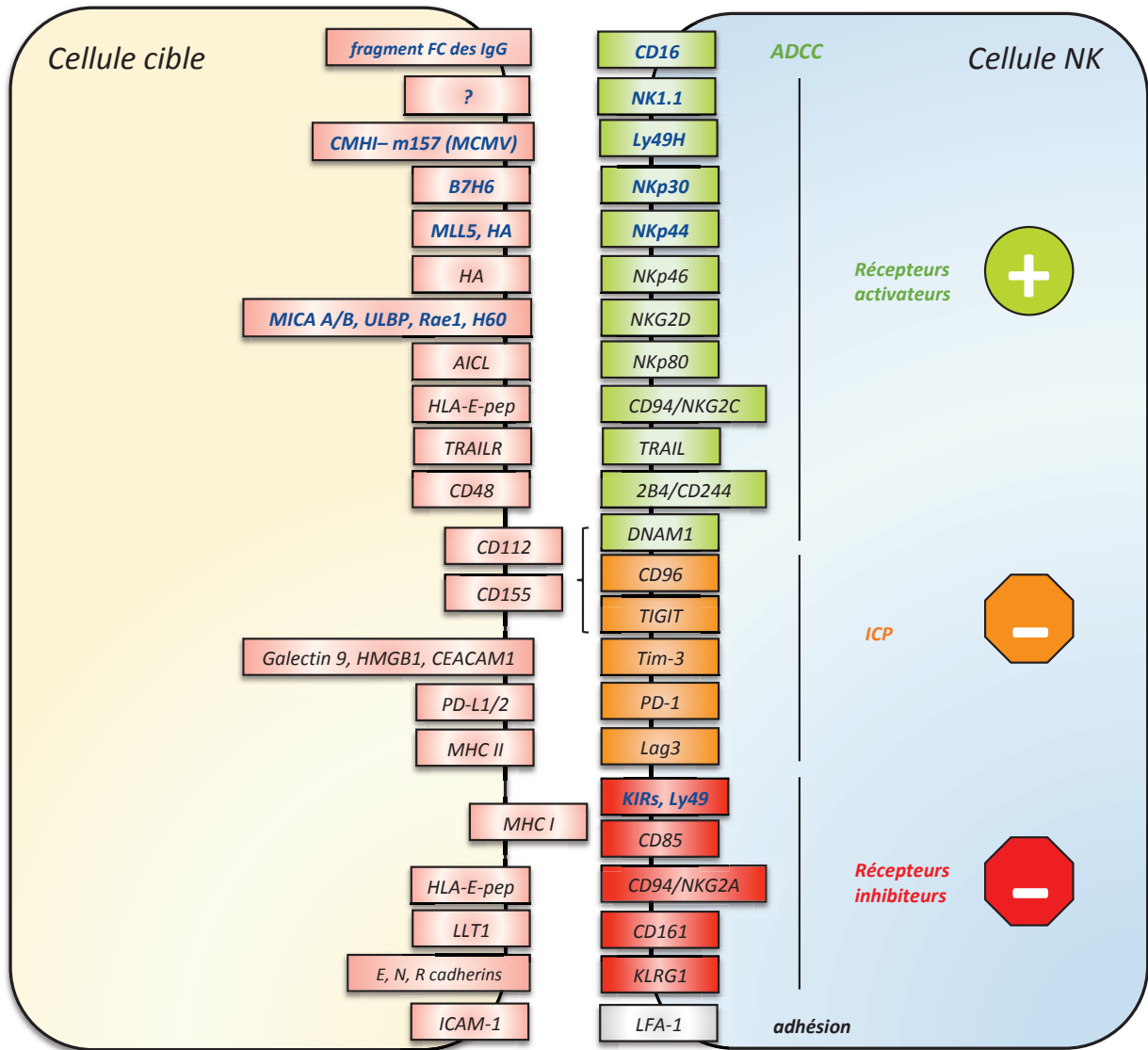
NKG2D (pour Natural Killer receptor Groupe 2, membre D) fut identifié comme le récepteur aux ligands de stress MICA et MICB (MHC Class I related proteins A et B) qui sont souvent exprimés dans les tumeurs épithéliales telles que dans le cancer du poumon, du sein, du rein, de l'ovaire, de la prostate et du colon (Bauer et al., 1999). Ce récepteur de la famille des lectines de type C est exprimé par les cellules NK, les lymphocytes T  $\gamma\delta$  et les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. Il fonctionne comme un puissant récepteur activateur en se liant à la protéine adaptatrice DAP 10 qui via son domaine SH2 peut recruter la sous unité p85 de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) et ainsi propager le signal (Wu et al., 1999). NKG2D a de multiples ligands ; en effet il peut lier un certain nombre de protéines du « soi induit par le stress ». On peut citer chez l'homme comme nous l'avons vu, les ligands MICA et MICB mais aussi six membres de la famille des protéines liant UL16 (ULBP, UL16 binding proteins). Chez la souris, les ligands de NKG2D sont les cinq protéines Rae1 (retinoic acid early inducible 1) de Rae1 $\alpha$  à Rae1 $\epsilon$ , MULT1 (murine UL16 binding protein like transcript 1) et le complexe mineur d'histocompatibilité H60 (Diefenbach et al., 2001).

- *DNAM-1*

Autre récepteur de la super famille des immunoglobulines (Ig), DNAM-1 pour DNAX accessory molecule (dont l'autre nom est CD226) est une molécule d'adhésion exprimée à la surface des cellules NK, des LT et des monocytes (Shibuya et al., 1996). Ses ligands ont pu être identifiés comme étant le récepteur au poliovirus (PVR, CD155) et Nectin 2 (CD112) (Bottino et al., 2003a). Il est caractérisé par la présence de deux domaines extracellulaires « Ig like » et d'une queue cytoplasmique pouvant lier la kinase Fyn pour transduire le signal et conduire au déclenchement de la cytotoxicité. L'expression de DNAM-1 par les cellules NK semble nécessaire pour l'élimination de certaines tumeurs n'exprimant pas les ligands de NKG2D (Chan et al., 2010). Enfin, chez la souris, DNAM-1 est exprimé de façon binaire et définit ainsi deux populations : les cellules NK DNAM-1<sup>+</sup> et les cellules NK DNAM-1<sup>-</sup> (Martinet et al., 2015). Les premières ont une meilleure capacité proliférative, elles produisent plus de cytokines pro-inflammatoires et ont des fonctions anti-tumorales plus importantes que les cellules NK DNAM-1<sup>-</sup> qui produisent, elles, essentiellement des chimiokines. Il est important de noter que DNAM-1 va de paire avec deux récepteurs inhibiteurs : TIGIT et CD96. Ils reconnaissent les mêmes ligands mais ont des effets opposés sur la cellule NK (Chan et al., 2014; Stanietsky et al., 2013).

Enfin, d'autres NKaR existent tels que :

- NKp80 un autre NCR qui lie son ligand AICL (« activation induced type C lectin »)
- NKG2C qui comme son homologue inhibiteur (NKG2A) va se lier avec la chaîne invariante CD94 et reconnaître HLA-E (Braud et al., 1998). Cet exemple de couple NKiR/NKaR partageant un même ligand n'est pas unique. En effet, plusieurs récepteurs activateurs vont de pair avec un équivalent inhibiteur avec lequel ils partagent un même ligand, reconnu cependant avec une affinité différente (Barrow and Trowsdale, 2008).
- des récepteurs de la famille SLAM (« signaling lymphocyte activation molecule ») (revue de Veillette, 2006) dont par exemple 2B4 qui possède un rôle double (activateur et inhibiteur)
- des récepteurs de la famille KIR/Ly49 qui présentent des fonctions activatrices. C'est le cas par exemple de Ly49H qui est impliqué dans la reconnaissance du



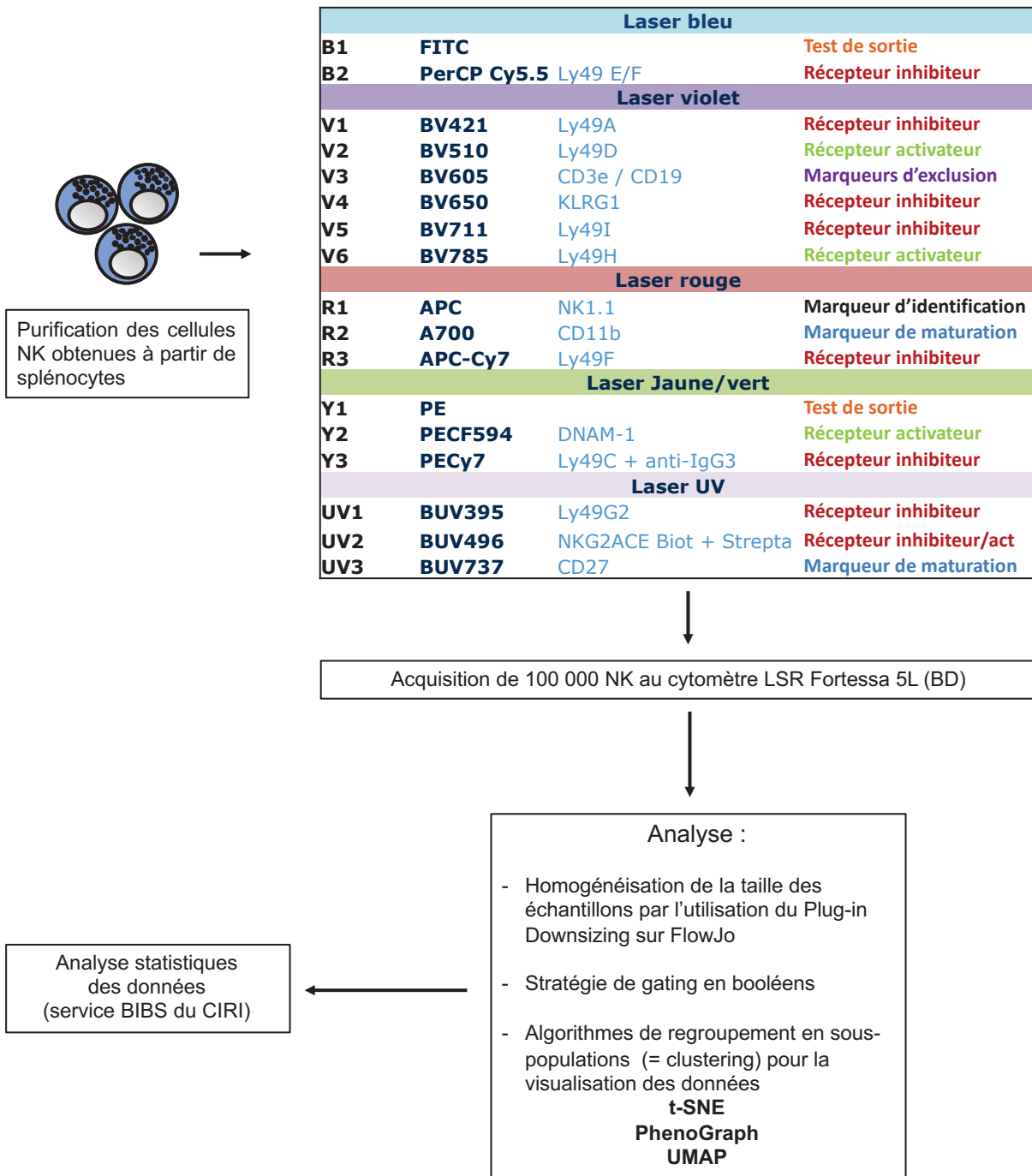
Adapté de Vivier et al., 2008

### Figure 9: Principaux récepteurs des cellules NK

Les différences homme/souris sont indiquées en bleu sur la figure. CD16, NKp30 et NKp44 ne sont présents que chez l'homme alors que NK1.1 ne l'est que chez la souris. Les cellules NK murines n'expriment pas de KIR mais expriment en revanche des récepteurs Ly49 qui sont l'équivalent fonctionnel des KIR. Ly49H est un récepteur murin particulier qui reconnaît la protéine virale m157. Les ligands de NKG2D vont également différer entre les deux espèces.



## Panel Répertoire



Méthode développée par Y. Rocca, post-doctorante dans l'équipe T. Walzer

### Figure 10: Chemin d'analyse du répertoire

L'étude du répertoire NK est réalisée à partir de cellules NK isolées et purifiées par la technologie MACS. Le panel de cytométrie présenté permet d'identifier théoriquement 4096 populations caractérisées par l'expression d'une combinaison de récepteurs. Les récepteurs étudiés ici présentent une expression de type binaire (est exprimé ou n'est pas exprimé). L'analyse est ensuite basée sur l'utilisation d'algorithmes de regroupement en population (t-SNE, PhenoGraph ou UMAP). Une étude plus exhaustive peut être faite via l'analyse des booléens.

cytomégalovirus murin (CMV) via la liaison avec un CMH-I présentant le peptide m157 du virus (Arase et al., 2002) ou des KIR-S comme nous l'avons mentionné plus haut.

L'éventail de récepteurs exprimés par les cellules NK et les interactions avec leur(s) ligand(s) sont résumés en **Figure 9**.

Certains récepteurs sont exprimés par toutes les cellules NK. A l'inverse, il est important de noter que d'autres récepteurs sont exprimés de manière stochastique. Chaque cellule NK exprime donc un sous-ensemble de ces récepteurs de façon indépendante des autres cellules NK. Cette particularité va permettre de définir un répertoire constitué par l'ensemble des combinaisons de récepteurs exprimés sur différentes sous-populations. Dans l'équipe nous avons développé un panel de cytométrie en flux multiparamétrique permettant l'analyse de ce répertoire chez la souris. Pratiquement, cette étude se fait en utilisant différents algorithmes (Boolean gating, t-SNE, PhenoGraph, UMAP) qui permettent le regroupement des cellules NK en sous-populations exprimant la même combinaison ou des combinaisons proches de récepteurs. Le chemin d'analyse ainsi que le panel utilisé sont présentés en **Figure 10**.

### **c- Signalisation ITAM/ITIM**

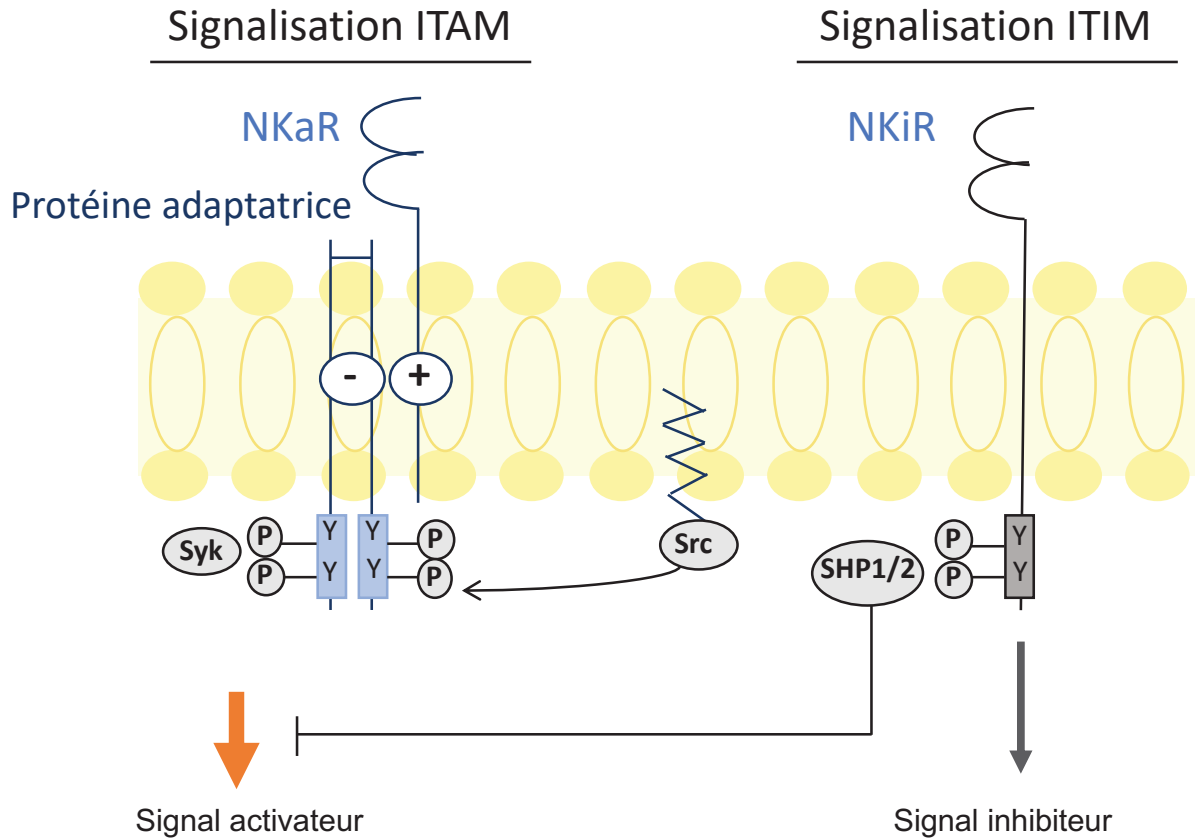
Les récepteurs activateurs interagissent avec la machinerie de signalisation intracytoplasmique grâce à leur association avec des protéines adaptatrices telles que CD3 $\zeta$ , Fc $\epsilon$ R1 $\gamma$  et DAP12. Ces protéines contiennent des motifs ITAM (pour « immune tyrosine based activating motifs ») dont la séquence consensus est la suivante YXXL/I(X6-8)YXXL/I (Billadeau and Leibson, 2002). Suite à l'engagement du récepteur, ces motifs ITAM vont être phosphorylés au niveau des tyrosines (Y) par des tyrosines-kinases de la famille Src. Puis, ces motifs ainsi phosphorylés vont permettre le recrutement des tyrosines kinases Syk et ZAP70 qui vont propager le signal en activant différentes voies de signalisation telles que la voie de la PI3K, de la phospholipase C gamma (PLC $\gamma$ ) ou d'autres voies (Vav, etc...) (Lanier, 2005). A

noter que ce sont les mêmes voies qui sont mises en jeu suite à l'engagement du TCR des lymphocytes T.

Les récepteurs inhibiteurs ont comme caractéristique commune de présenter des motifs ITIM (immunoreceptor tyrosine based inhibition) de séquence consensus V/I/L/X<sub>Y</sub>XXL/V dans leur partie intra-cytoplasmique (Burshtyn et al., 1996). Des études pionnières ont montré que l'inhibition du signal activateur via les récepteurs inhibiteurs se produit très rapidement, en amont de l'influx calcique (Kaufman et al., 1995). Ces motifs ITIM, une fois phosphorylés par la kinase Src suite à l'engagement du récepteur, vont recruter les tyrosine-phosphatases SHP-1 et SHP-2 via leur domaine SH2 (Long, 2008). Puis le signal activateur est abrogé par l'action de SHP-1 qui déphosphoryle ses substrats Vav-1 (Stebbins et al., 2003) et SLP76 (Binstadt et al., 1998). L'opposition entre les signalisations ITAM et ITIM est présentée en **Figure 11** et les différentes voies de signalisation découlant de l'activation sont schématisées dans la **Figure 12**.

#### **d- Flux calcique**

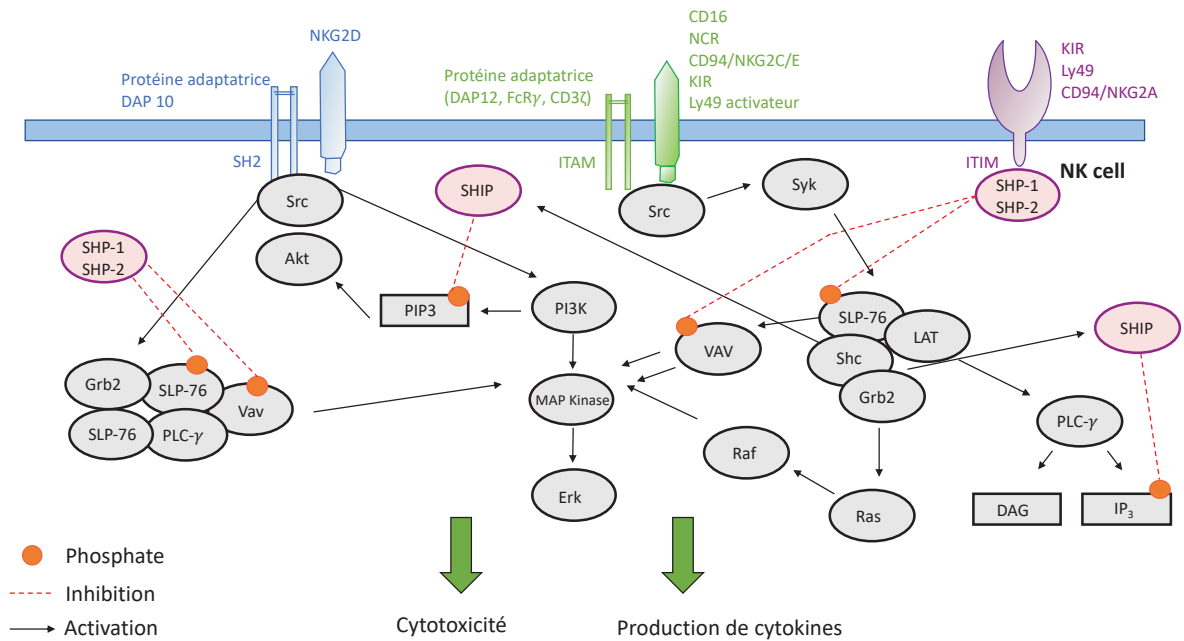
Le calcium est un second messager universel impliqué dans de nombreuses voies de signalisation. Concernant les cellules immunitaires, il contribue notamment à leur activation, à la mise en place de leurs fonctions effectrices, à l'expression de certains gènes et à leur différenciation. Des signaux calciques ont été mis en évidence dans les lymphocytes T, B, NK, les cellules dendritiques (DC), les monocytes et les macrophages (Feske, 2007). Ainsi, dans les cellules NK, le calcium (abrégé  $Ca^{2+}$ ) constitue un signal précoce dans la voie de signalisation qui découle de la reconnaissance d'une cible sensible à la lyse NK (Edwards et al., 1989). Ce flux est caractérisé par la libération de calcium provenant des réserves intracellulaires suivi d'un afflux de calcium extracellulaire. Ces flux trouvent leur origine dans l'activation de la phospholipase C (PLC)- $\gamma$ , qui une fois activée, catalyse l'hydrolyse du phosphatidyl inositol 4,5 bi phosphate ( $PIP_2$ ) en diacylglycérol (DAG) et en inositol 1,4,5 tri-phosphate ( $IP_3$ ). L' $IP_3$  active des canaux calciques à la surface du réticulum endoplasmique (RE) et permet leur ouverture libérant ainsi un stock intracellulaire de



*Adapté de Vivier et al., 2004*

### **Figure 11: Signalisation ITAM/ITIM**

Lorsque le NKaR est engagé, cela conduit à la phosphorylation des tyrosines présentes au niveau du motif ITAM des protéines adaptatrices. Une fois phosphorylées, ces tyrosines permettent le recrutement de la kinase Syk qui va à son tour phosphoryler ses substrats permettant de propager le signal activateur et d'induire les voies de signalisation nécessaires. En revanche, en cas d'engagement d'un NKiR, la phosphorylation des tyrosines au niveau du domaine ITIM recrute les phosphatases SHP-1/2 capables d'inhiber de manière directe et indirecte les voies de signalisation activées par la signalisation ITAM.

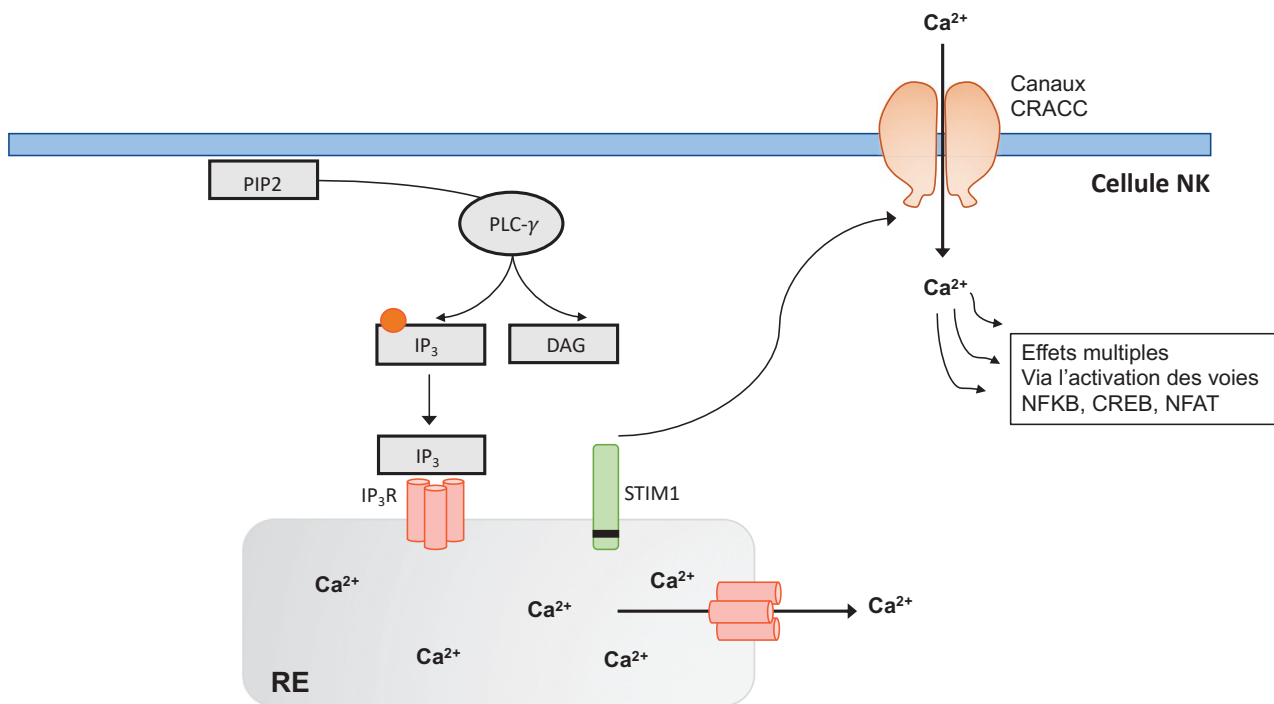


*Adapté de Vivier et al., 2004*

### **Figure 12: Principales voies de signalisation dans les cellules NK**

Le signal activateur est propagé via le recrutement des kinases de la famille Src qui vont phosphoryler leurs substrats et ainsi permettre d'activer différentes voies dans la cellule NK conduisant à la mise en place des fonctions effectrices. Ces voies peuvent être inhibées en cas d'activation des NKiR. La phosphatase SHP-1 recrutée au niveau du motif ITIM conduit à la déphosphorylation de son substrat Vav ce qui empêche la transduction en aval du signal.

$\text{Ca}^{2+}$  (Figure 13). La diminution de la quantité de  $\text{Ca}^{2+}$  est perçue par un senseur à la surface du RE qui active alors les canaux calciques CRACC présents au niveau de la membrane plasmique entraînant ainsi l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule. Ce  $\text{Ca}^{2+}$  participe alors à l'activation en interagissant avec des enzymes dont l'activité dépend du  $\text{Ca}^{2+}$  mais aussi en activant certains facteurs de transcription.



Adapté de Feske, 2007

### Figure 13: Flux calcique dans les cellules NK

Suite à l'activation de la cellule NK, la phospholipase PLC- $\gamma$  peut hydrolyser le PIP2 en IP<sub>3</sub> et DAG. L'IP<sub>3</sub> va fixer son récepteur au niveau du RE permettant la sortie de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytoplasme. Le senseur STIM-1 présent à la surface du RE détecte des niveaux de  $\text{Ca}^{2+}$  plus bas et active ainsi les pompes membranaires CRACC ce qui résulte en l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule et à l'activation de différentes voies de signalisation. *RE* : réticulum endoplasmique, *CRACC* : « calcium release-activated calcium channel », *STIM-1* : « stromal interaction molecule 1 ».

## **2.2 Fonctions effectrices des cellules NK**

Les cellules NK ont deux fonctions effectrices majeures qui sont 1- une fonction de cytotoxicité c'est à dire de lyse de la cellule anormale et 2- la production de cytokines notamment d'IFN- $\gamma$ .

### **2.2.1 Activation des cellules NK**

#### **a- Lyse naturelle**

Comme nous l'avons vu précédemment, l'activation des cellules NK met en jeu deux types de reconnaissance : « missing self » et « soi induit ». Ainsi, si la cellule rencontrée a perdu l'expression du CMH-I, l'inhibition est levée, ce qui active la cellule NK. De plus, les cellules anormales expriment des ligands des récepteurs activateurs. Il peut s'agir de non soi d'origine infectieux (cas des cellules infectées) ou de soi induit par le stress (cas des cellules tumorales). Lorsque la balance penche en faveur des signaux activateurs, la cellule NK déclenche ses fonctions effectrices. C'est ce que l'on appelle communément la lyse spontanée ou naturelle.

Dans les tests de fonctionnalité des cellules NK, les cellules prototypes K562 et YAC-1 sont utilisées car elles n'expriment pas les molécules du CMH-I. Il est également possible de tester l'activation des cellules NK en utilisant des anticorps agonistes, permettant de stimuler les NKaR comme par exemple l'anticorps PK136 (un anti-NK1.1).

#### **b- ADCC : activation dépendante des anticorps**

Une autre voie d'activation des cellules NK est la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC). Ici, les cellules NK sont activées via leurs récepteurs aux parties constantes (Fc) des immunoglobulines de sous type G (IgG) (FC $\gamma$ R). Cette

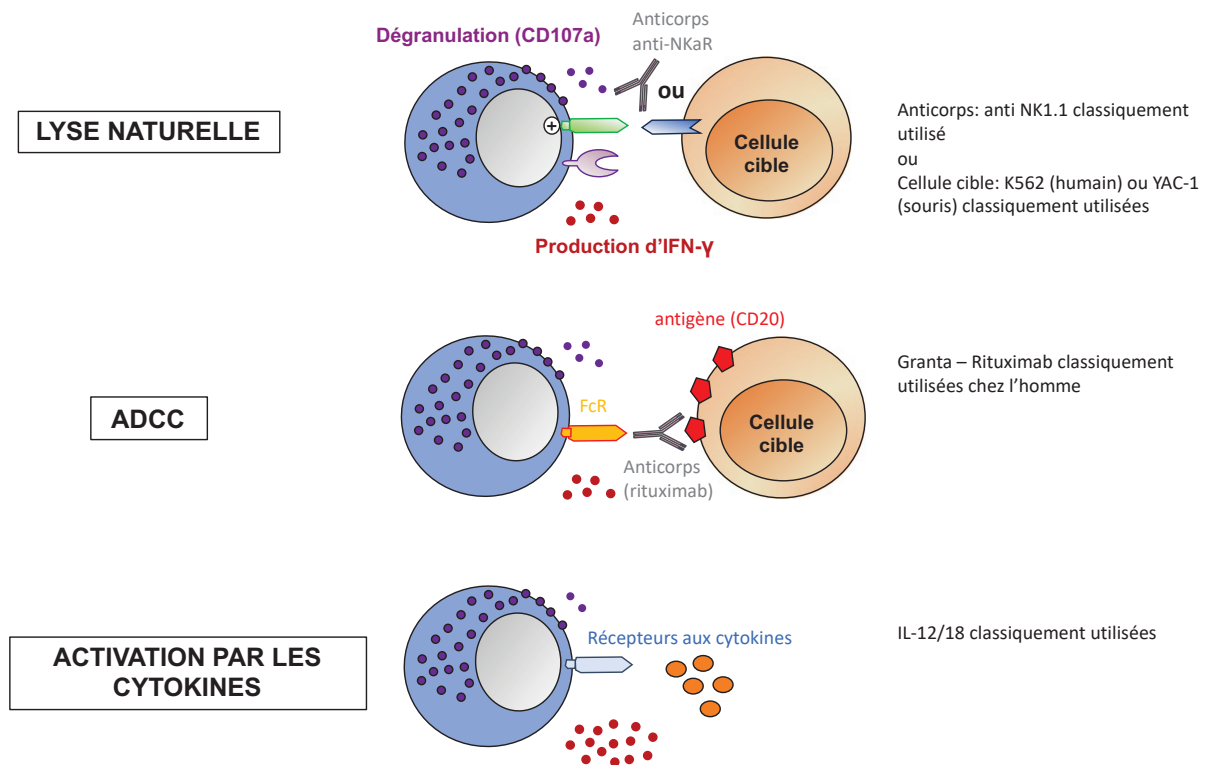
activation induit la lyse des cibles recouvertes d'anticorps ayant reconnu des antigènes exprimés à leur surface (Anegón et al., 1988). Les cellules NK peuvent également s'activer par reconnaissance des complexes immuns formés entre des antigènes et des anticorps circulants (Perussia et al., 1984).

Il existe trois grandes classes de FCγR qui peuvent être activateurs ou inhibiteurs et qui présentent différents degrés d'affinité avec leur ligand (revue de Nimmerjahn and Ravetch, 2008). FCγRI (CD64) est exprimé à la surface des macrophages et des neutrophiles. FCγRII (CD32) et FCγRIIIa (CD16) sont exprimés, chez l'homme, à la surface des cellules NK (NK CD56<sup>dim</sup>) ainsi que d'autres cellules hématopoïétiques et vont permettre de déclencher l'ADCC.

Bien que CD16 soit un récepteur activateur de faible affinité, les cellules NK n'expriment pas le corécepteur inhibiteur FCγRIIIb (revue de Seidel et al., 2013), ce qui facilite donc leur activation. L'engagement du récepteur induit la phosphorylation de son domaine ITAM par des kinases de la famille Src pour activer une cascade identique à celle détaillée dans la partie signalisation ITIM/ITAM. Certains anticorps monoclonaux sont utilisés pour le traitement de cancers, c'est le cas du Trastuzumab (anti-HER2) dans le cancer du sein ou du Rituximab (anti-CD20) dans le traitement du lymphome non Hodgkinien. Le mode d'action initialement envisagé pour ces anticorps reposait sur leur capacité à interférer avec la croissance tumorale en bloquant respectivement la molécule HER2 (exprimée par les cellules épithéliales malignes dans le cancer du sein) et CD20 (exprimé par les lymphocytes B dont les cellules lymphomateuses). Il a été ensuite montré que leur effet conséquent sur la pousse tumorale passe aussi par les récepteurs FCγRIIIa et donc par un mécanisme d'ADCC (Clynes et al., 2000).

Afin de mesurer l'ADCC lors d'analyse de fonctionnalité des cellules NK humaines, les laboratoires utilisent classiquement des lignées de lymphome B comme la lignée Granta, recouverte préalablement avec des anticorps anti-CD20 (Rituximab) (Deguine et al., 2012 ; Rudnicka et al., 2013). L'engagement de ces récepteurs peut être régulé par des métallo protéinases matricielles (MMP) comme par exemple la protéine ADAM17 qui clive CD16 (Romee et al., 2013) et empêche donc le maintien du signal.





### Figure 14: Les différents modes d'activation des cellules NK et les tests fonctionnels utilisés

Les cellules NK peuvent être activées de trois manières différentes : par des cellules cibles, par les Fc récepteurs qui reconnaissent la partie constante des anticorps liés à des antigènes circulants ou présentés par des cellules cibles et enfin par des cytokines. Les tests fonctionnels utilisés dans les laboratoires sont résumés à droite. La fonctionnalité des cellules NK est évaluée via la mesure de la dégranulation (marqueur lysosomal CD107a présent à la surface) qui est un corollaire de la cytotoxicité et via le pourcentage de cellules ayant produit de l'IFN- $\gamma$  (marquage intracellulaire).

## c- Activation dépendante des cytokines

Comme nous le verrons par la suite, les cellules NK sont régulées par différentes cytokines dont les récepteurs partagent la chaîne commune  $\gamma_c$  (CD132) comme par exemple l'IL-2, l'IL-4, l'IL-7, l'IL-9, l'IL-15 ou encore l'IL-21 (Marçais et al., 2013). Elles vont avoir plusieurs actions comme permettre la prolifération des cellules NK ou potentialiser la cytotoxicité. De plus, la combinaison IL-12/IL-18 est notamment un puissant activateur de la production d'IFN- $\gamma$ . Les deux agissent en synergie : l'IL-12 augmente la synthèse transcriptionnelle de l'ARN messager de l'IFN- $\gamma$  via la translocation nucléaire de STAT4 et l'IL-18 permet de stabiliser cet ARN messager via l'activation de la voie NF $\kappa$ B notamment (Chan et al., 1992; Robinson et al., 1997; Takeda et al., 1998).

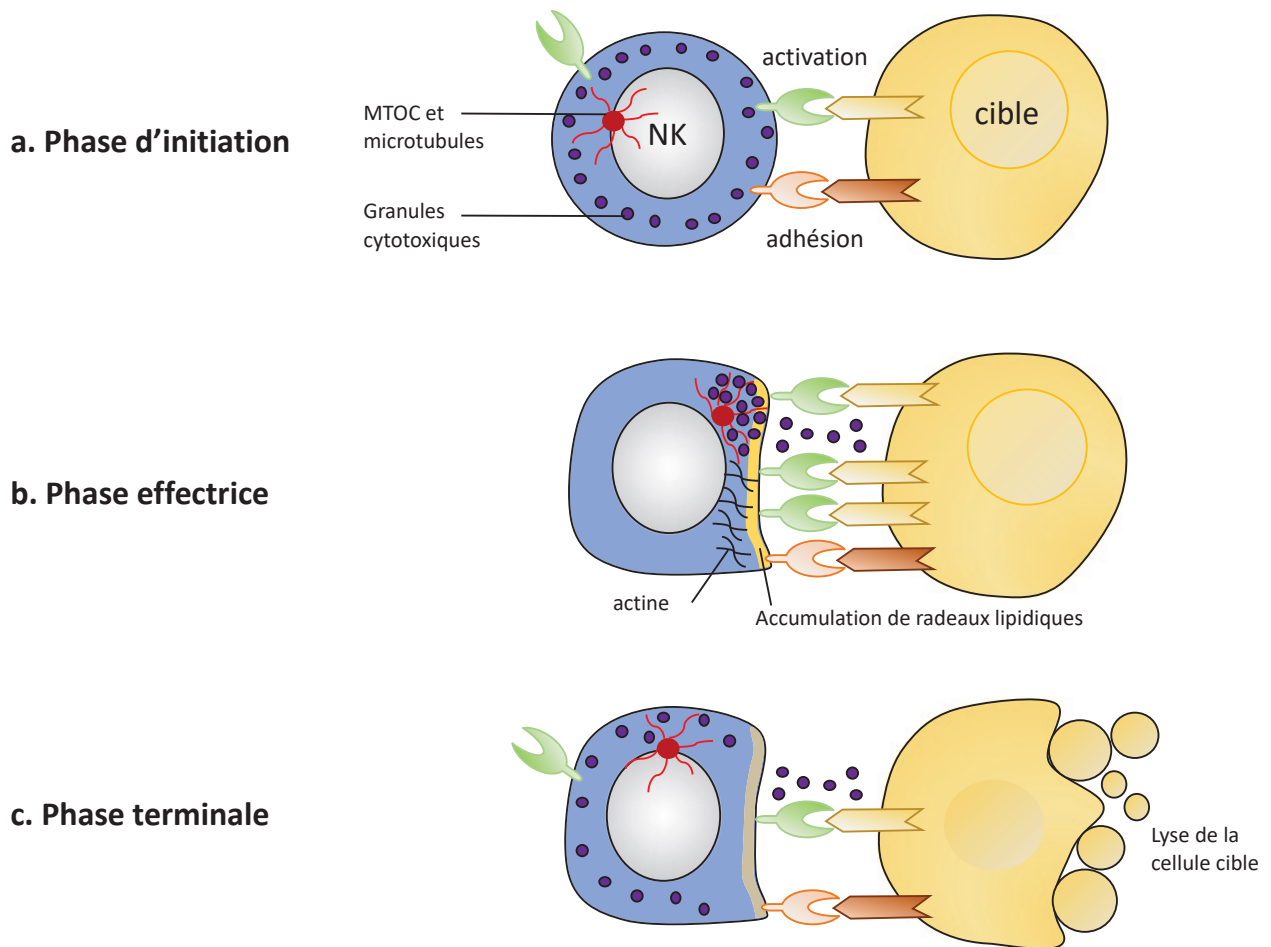
Ces trois voies d'activation (lyse naturelle, ADCC, activation par les cytokines) résumées en **Figure 14** peuvent être testées *in vitro* pour refléter l'activation des cellules NK.

### 2.2.2 Formation de la synapse

Au cours de leur patrouille ou de leur recrutement au site d'inflammation via des signaux chimiotactiques, les cellules NK rencontrent des cellules cibles potentielles. L'interface dynamique qui se forme entre une cellule NK et sa cible, appelée synapse immunologique, permet l'échange d'informations allant de la cellule cible à la cellule NK et vice-versa. C'est la première étape du processus de cytotoxicité. En effet, la synapse est le lieu de libération des granules cytotoxiques qui sont des lysosomes sécrétoires contenant des agents cytotoxiques.

#### 1- Phase d'initiation : contact et reconnaissance de la cible

La première étape de la mise en place de la synapse est la formation de conjugués entre une cellule NK et sa cible.



*Adapté de Orange, 2008*

### **Figure 15: Formation de la synapse**

La cellule NK forme un conjugué avec sa cellule cible via une étape d'adhésion permise par l'interaction LFA-1/ICAM-1 (phase d'initiation). Puis le réarrangement du cytosquelette d'actine et l'accumulation de radeaux lipidiques permettent le regroupement des récepteurs activateurs au niveau de la synapse et la formation de canaux pour amener les granules cytolytiques (apportés via les microtubules) au niveau de la membrane plasmique (phase effectrice). Enfin, le contenu des granules est libéré conduisant à la lyse de la cellule cible et au détachement de la cellule NK (phase terminale).

Il y a tout d'abord une période d'interaction faible, « d'attache », probablement permise par le corécepteur CD2, puis une étape d'adhésion permise par l'interaction entre l'intégrine LFA-1 (« lymphocyte function associated antigen 1 », CD11a/CD18) avec son ligand ICAM-1 (CD54). Les intégrines se regroupent à la synapse, forment des structures d'adhésion et vont pouvoir participer à l'activation de la signalisation. A cette étape, les récepteurs activateurs sont susceptibles d'être engagés par leurs ligands exprimés sur les cellules cibles. Cette étape peut être régulée via des signaux transmis par les récepteurs inhibiteurs qui pourraient notamment établir des synapses plutôt « inhibitrices ». En revanche, il est difficile de distinguer si l'on assiste à la formation d'une synapse « inhibitrice » réelle ou si au contraire la formation de la synapse est déstabilisée et ne touche donc que cette première phase d'initiation pour aboutir à une terminaison anticipée. On observe donc un contrôle fin permettant d'épargner les cellules saines et de dégranuler uniquement face à de vraies cibles (Masilamani et al., 2006). Les étapes de formation de la synapse sont résumées en **Figure 15**.

## 2- Phase effectrice :

Si les signaux activateurs dominant sur les signaux inhibiteurs, on assiste à la formation d'une synapse mature. Celle-ci débute par la réorganisation du cytosquelette d'actine avec formation d'un réseau de filaments d'actine (Actine-F) à partir des monomères d'actine (Actine-G) (Carpén et al., 1983). La formation de cet important réseau est notamment conduite par la protéine WASP (Wiskott Aldrich Protein) (Orange et al., 2002). C'est d'ailleurs une cible de SHP-1 qui en déphosphorylant Vav, inhibe cette étape (Stebbins et al., 2003). En parallèle, on assiste à la formation de radeaux lipidiques (type rafts) au niveau de la synapse. Leur intégrité est absolument nécessaire à la création de cette zone de contact avec la cellule cible (Lou et al., 2000). Les récepteurs activateurs se regroupent au niveau de ces points de contact et leur mobilité latérale est permise par les protéines ERM (Ezrine, radixine, moésine) qui sont présentes au niveau de la synapse (Ramoni et al., 2002). Puis, la polarisation des granules lytiques au niveau de la membrane, se met en place par migration en direction du MTOC (centre d'organisation des microtubules) via le réseau de microtubules avec comme moteur, des molécules de Dynéine. Ce centre, en parallèle, se localise à la synapse via les voies Erk, Vav et

PYK2 (Chen et al., 2006; Graham et al., 2006; Sancho et al., 2000). Une fois proche de la synapse, les microtubules s'insèrent dans les filaments d'actine qui sont organisés de manière à créer des conduits larges de 1 à 4  $\mu\text{m}$  de diamètre par lesquels les granules vont pouvoir atteindre la membrane plasmique (Orange, 2008). Le moteur qui paraît être impliqué dans ce passage à travers les filaments d'actine est la myosine II (Andzelm et al., 2007). La membrane des granules peut ensuite fusionner avec la membrane plasmique de manière à relarguer leur contenu dans l'interstice formé entre les deux cellules. Le déchargement de cette cargaison se fait via des protéines de la famille des petites GTPases telles que Rab, une protéine pouvant lier les granules et interagir avec la membrane plasmique (Ménager et al., 2007).

### 3- Phase terminale :

Les granules sont libérés au niveau de la fente qui a probablement un rôle d'accumulation. Elle servirait à concentrer et à piéger les molécules cytotoxiques au niveau de la cible, afin de protéger les cellules avoisinantes d'une mort non nécessaire. Une fois l'exocytose des granules réalisée, les cellules NK se détachent et peuvent aller fixer une autre cible démontrant ainsi leur capacité à « tuer en série ». Néanmoins, les mécanismes de désensibilisation restent peu définis et nous verrons par la suite qu'en cas de stimulation chronique, les cellules NK ne parviennent plus à tuer leur cible. Cela pourrait être lié aux mécanismes de désensibilisation qui leur permettent de se détacher.

Ce processus peut être analysé en réponse à différents stimuli, en mesurant par cytométrie, l'expression au niveau de la membrane plasmique du marqueur de dégranulation CD107a (exprimé à la surface des lysosomes et qui sera donc présent à la membrane après fusion et dégranulation).

### 2.2.3 Mécanismes de cytotoxicité

Les cellules NK sont capables d'induire la mort rapide de leur cible, en quelques minutes ou quelques heures selon le système utilisé (Smyth et al., 2005) (Figure 16).

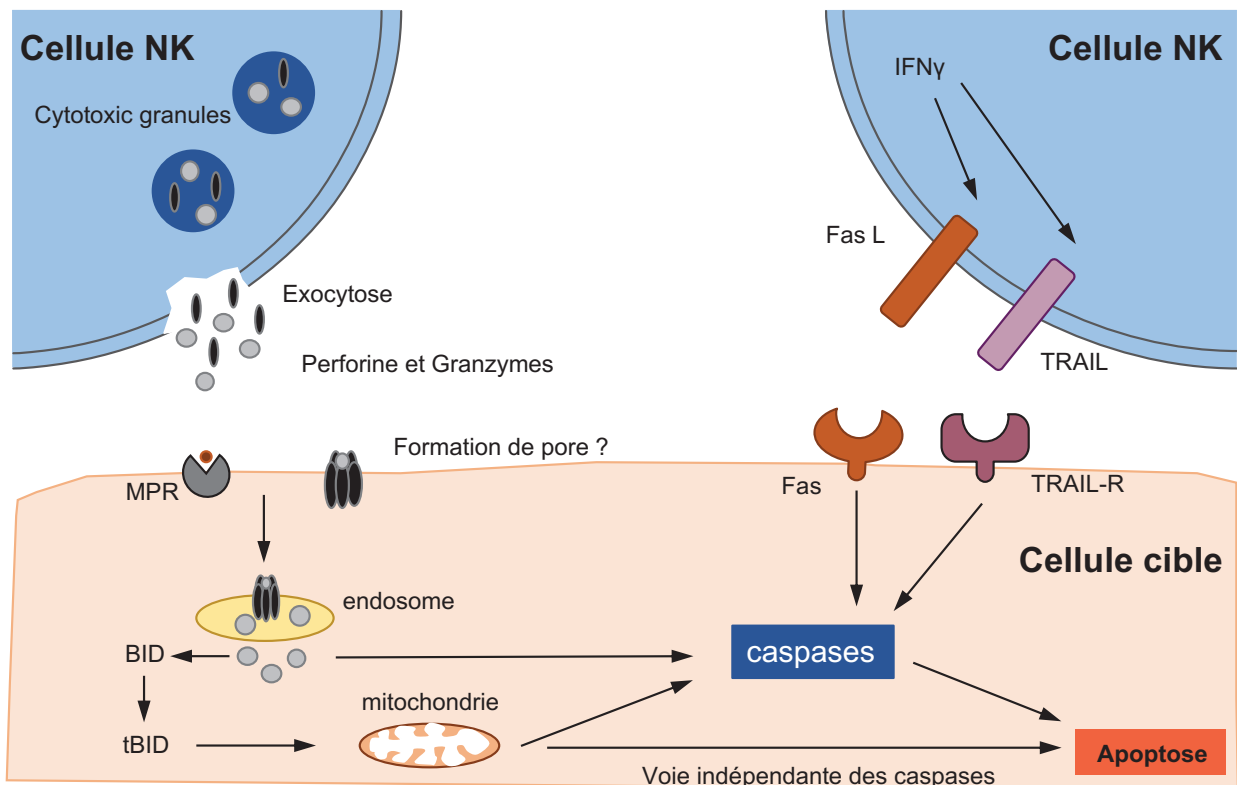
#### a- Système perforine/granzyme

Les molécules cytotoxiques perforine et granzyme sont contenues dans les granules cytotoxiques et sont donc libérées dans la fente synaptique. Contrairement aux lymphocytes T naïfs, les granules cytolytiques sont déjà préformés dans les cellules NK (Rudnicka et al., 2013) ce qui suggère une régulation plus fine de leur sécrétion comparée à ce qui se produit dans les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. En revanche, un traitement avec de l'IL-2 recombinante par exemple, conduit à des changements structuraux tels qu'un agrandissement de l'appareil de Golgi et une plus grande production de granules. La cytokine IL-2 permet donc une disponibilité accrue mais également un taux de relargage plus important de facteurs cytotoxiques et favorise ainsi la cytotoxicité des cellules NK.

La perforine est une enzyme de type serine protéase. A l'origine, elle était décrite comme nécessaire à la création de pores dans la membrane de la cellule cible afin de permettre le passage des molécules de granzyme (revue de Trapani and Smyth, 2002).

Les granzymes sont également des enzymes de type serine protéases. Il existe 11 types différents (A, B, C, D, E, F, G, H, K, M et N). 10 sont exprimés chez la souris et 5 chez l'homme (Trapani and Smyth, 2002), la mieux décrite étant la forme B (GzmB). Granzyme B est capable de déclencher la mort des cellules par apoptose via l'activation des caspases cellulaires.

Ces deux facteurs (Perforine et GzmB) sont essentiels pour la cytotoxicité des cellules NK (Heusel et al., 1994) cependant la perforine pourrait, en fait, se lier au



Adapté de Smyth et al., 2005

### Figure 16: Mécanismes de cytotoxicité

Plusieurs mécanismes peuvent conduire à la lyse de la cellule cible. L'exocytose de granules cytotoxiques contenant des molécules de perforine et de granzyme suit l'activation de la cellule NK au niveau de la synapse immunologique. Une fois captées par la cellule cible par endocytose, via le MPR, ou suite à la formation perforine dépendante de pores dans la membrane, les molécules de granzymes vont déclencher l'apoptose de la cellule cible en activant la cascade des caspases ou en activant le facteur BID pouvant agir sur la mitochondrie. L'autre voie possible est dépendante des récepteurs de mort Fas et TRAIL-R qui par reconnaissance de leur ligand exprimé sur les cellules NK (FasL et TRAIL respectivement) activent également la cascade des caspases.

*MPR : Récepteur au mannose 6 phosphate, BID : BH3 interacting domain death agonist.*

niveau d'un complexe macromoléculaire formé à la membrane et servirait à déstabiliser le trafic endosomal une fois les molécules de granzymes absorbées par la cellule cible (Trapani and Smyth, 2002). En effet, le passage des molécules de granzyme dans le cytoplasme de la cellule cible ne fait pas forcément intervenir la perforine et peut être passif et se produire par endocytose. Il a notamment été montré que le récepteur du Mannose-6-phosphate (MPR) peut capter les molécules de granzymes et les faire pénétrer dans la cible par endocytose. Granzyme B peut déclencher l'apoptose de la cellule cible en suivant deux voies :

- Voie dépendante des caspases :

GzmB joue un rôle à deux niveaux de l'activation de cette voie. En tant que protéase, elle peut directement cliver les caspases, notamment les caspases 3 et 7 (Yang et al., 1998). Cependant, elle peut également déclencher la cascade d'activation des caspases de manière indirecte. Il a été montré que GzmB peut activer le facteur pro-apoptotique BID (BH3 interacting domain death agonist) par clivage (Sutton et al., 2000). BID est ensuite impliqué dans le relargage de facteurs mitochondriaux notamment le cytochrome c dans le cytoplasme de la cellule (Heibein et al., 2000) via d'autres effecteurs tels que Bax (Bcl2 associated X protein) et Bak (Bcl2 homologous antagonist killer). Le relargage de cytochrome c conduit alors à la formation de l'apoptosome et à l'activation de la caspase 9. Cette dernière clive la pro-caspase-3 qui s'active et déclenche la mort de la cellule cible.

- Voie indépendante des caspases :

GzmB cause également une importante dépolarisation des mitochondries via une perte du potentiel mitochondrial essentiel aux fonctions cellulaires (synthèse d'ATP et signalisation calcique) (Thomas et al., 2001). D'autre part, elle peut directement cliver certains substrats des caspases tels que PARP, DNA-PK, et NuMA (Andrade et al., 1998).

Enfin, il existe des mécanismes de protection empêchant la lyse de la cellule cytotoxique qui pourrait survenir en cas de fixation de la perforine à la membrane de la cellule effectrice. Ceci passe par la cathepsine B, également contenue dans les



granules cytotoxiques, et qui, retenue au niveau de la membrane de la cellule NK, inhibe l'action de la perforine (Balaji et al., 2002).

## **b- Récepteurs de mort**

Parallèlement à cette première voie, les cellules NK expriment deux ligands, TRAIL et FasL, qui se fixent sur des récepteurs de mort à la surface des cellules cibles. L'engagement des récepteurs TRAILR et Fas conduit à l'activation des caspases, de l'apoptosome et à la mort de la cellule cible. Cependant, la lyse des cellules cibles via ces voies est plus lente que la lyse via le système Perforine/Granzyme (Prager et al., 2019; Zhu et al., 2016)

- *TRAIL* :

Le récepteur TRAILR (TNF related apoptosis inducing ligands receptor) est une protéine transmembranaire de type II de la superfamille des TNF. Parmi les cinq récepteurs identifiés, deux (TRAILR1 et TRAILR2) peuvent conduire à la transduction d'un signal apoptotique (Degli-Esposti, 1999) via leur domaine de mort. Les autres n'en possèdent pas mais servent de leurre pour réguler l'apoptose induite.

Par ailleurs, l'expression de TRAIL est fortement induite sur les cellules NK (humaines et murines) pré-stimulées par des cytokines (IL-2, IL-15 et IFNs) (Smyth et al., 2003).

- *Fas/FasL* :

Les cellules NK expriment également un autre ligand de récepteur de mort : FasL qui est reconnu par son récepteur Fas (CD95) exprimé à la surface des cellules cibles. Les cellules NK sont capables d'induire l'expression de Fas sur les cellules tumorales via leur production d'IFN- $\gamma$ , les rendant sensibles à une mort induite par Fas/FasL (Screpanti et al., 2001). Une fois le récepteur engagé, la protéine adaptatrice FADD est recrutée et active alors la caspase 8 qui induit le clivage de la pro-caspase-3.

## 2.2.4 Production de cytokines

La deuxième fonction majeure des cellules NK est la production de cytokines (Perussia, 1996). De la même manière que pour la dégranulation qui survient en quelques minutes, la sécrétion de ces messagers est rapidement induite, en quelques heures, après la reconnaissance de la cible et ne nécessite pas d'activation préalable. En cas d'infection ou de formation de tumeur, une multitude de cytokines va être produite par les cellules environnantes notamment les cellules sentinelles : cellules dendritiques (DC) et macrophages. Ces médiateurs cytokiniques ainsi sécrétés, qui peuvent être des interleukines de type IL-1, IL-10, IL-12, IL-15 et IL-18 vont activer les cellules NK qui amplifient à leur tour le signal d'inflammation en produisant notamment de l'IFN- $\gamma$  et du TNF- $\alpha$ . De plus, les premiers immuno-modulateurs à être produits par les cellules NK, sont des chimiokines, plus particulièrement les protéines inflammatoires de type « macrophage inflammatory protein » MIP1 $\alpha$  (CCL3) et MIP1 $\beta$  (CCL4), mais aussi RANTES (Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted, CCL5) (Fauriat et al., 2010a). Enfin, les cellules NK peuvent également sécréter des cytokines immuno-régulatrices comme IL-5 (Warren et al., 1995), IL-10 (Mehrotra et al., 1998) et IL-13 (Hoshino et al., 1999) et le facteur de croissance GM-CSF (Granulocyte macrophage colony stimulating factor) (Levitt et al., 1991) et potentiellement contribuer à la résolution de l'inflammation.



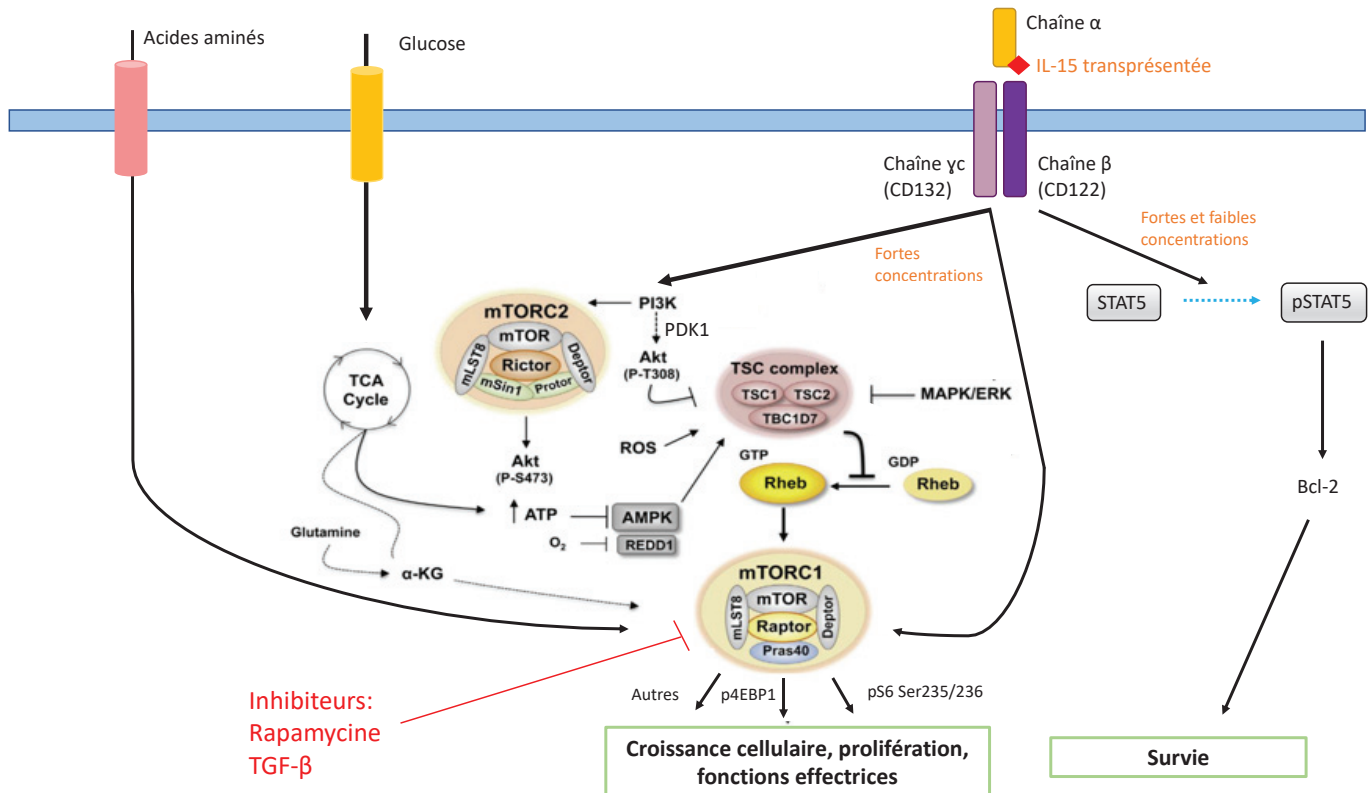
## 2.3 Régulation

Il existe plusieurs modes de régulation des cellules NK intervenant à différents niveaux (allant de leur développement à leur activation). Par ailleurs, la capacité des cellules NK à lyser une cellule cible dépend de deux aspects 1- l'intégration de la somme des signaux inhibiteurs et activateurs 2- la réactivité basale des cellules NK qui constitue leur capacité à répondre.

### 2.3.1 Régulation par les cytokines

La régulation des cellules NK passe par les interactions cellulaires avec les autres cellules du système immunitaire et par les cytokines produites. Fernandez *et al.*, démontrent pour la première fois en 1999, des contacts directs entre les cellules NK et les DC induisant une augmentation de l'activité NK (cytotoxicité et production d'IFN- $\gamma$ ) (Fernandez et al., 1999). En effet, les DC produisent de l'IL-12, capable d'induire la production d'IFN- $\gamma$  et de l'IL-15 qui augmente les fonctions effectrices.

Le rôle clé de l'IL-15 dans le contrôle du développement est mis en évidence par la réduction drastique du nombre de cellules NK dans des souris déficientes pour certains composants de la signalisation IL-15 (Lodolce et al., 1998). Cette cytokine est trans-présentée via la chaîne  $\alpha$  et lie son récepteur composé de la chaîne commune  $\gamma_c$  (CD132) et de la chaîne IL-2/15R $\beta$  (CD122) (Koka et al 2004). Elle permet la survie et la prolifération des cellules NK (Castillo et al., 2009) en conditions homéostatiques mais également en cas d'inflammation ou d'infection (Lucas et al., 2007a). Cependant, bien qu'indispensable pour la survie des cellules NK elle ne l'est pas pour la prolifération en condition homéostatique (Jamieson et al., 2004). Dans l'équipe, nous avons pu démontrer qu'à faible dose, cette cytokine induit la phosphorylation du facteur de transcription STAT5 permettant ainsi la survie des cellules NK. En revanche, à plus forte dose, elle signale notamment via l'activation de la kinase mammalian target of rapamycine (mTOR) qui est un régulateur clé du métabolisme, permettant la prolifération mais aussi l'acquisition des fonctions effectrices (Marçais et al., 2014). mTOR est la sous-unité catalytique de deux complexes interagissant avec des substrats différents et ayant différentes fonctions cellulaires: mTORC-1 et mTORC-2 (Huang and Fingar, 2014). Au sein de mTORC1,



Adapté de Huang and Fingar, 2014

### Figure 17: Signalisation de l'IL-15 et voie mTOR

La cytokine IL-15 couplée à la chaîne  $\alpha$  de son récepteur est trans-présentée à la cellule NK et lie son récepteur composé de CD132/CD122. A faible concentration, elle induit la phosphorylation du facteur de transcription STAT5 qui promeut l'expression du gène anti-apoptotique Bcl-2 permettant la survie des cellules NK. A plus forte concentration, elle va également conduire à l'activation du complexe mTORC-1 dans lequel la kinase mTOR est liée à Raptor ainsi qu'à d'autres protéines. L'activation de mTORC-1 est également dépendante de la voie PI3K qui entraîne l'activation de mTORC2 (où mTOR est liée à Rictor) ce qui conduit à la phosphorylation d'Akt sur la Serine 473. De plus, via PDK1 et la phosphorylation d'Akt sur la Thréonine 308, le complexe TSC est inhibé. Le complexe TSC qui régule négativement mTORC-1 en inhibant la petite GTPase Rheb-GTP, est aussi régulé par des senseurs des niveaux d'énergie (ATP) et de l'oxygène tels que la kinase AMPK et REDD-1 ou par la voie des MAP Kinases. La levée de l'inhibition participe donc également à l'activation de mTORC-1 qui va phosphoryler ses substrats comme S6K ou encore 4EBP1. Ceci va permettre l'augmentation de la traduction, la croissance cellulaire, la prolifération, et la régulation du métabolisme et des fonctions effectrices. Enfin, mTORC-1 peut être inhibé par la rapamycine de manière spécifique ou par le TGF- $\beta$ .

mTOR possède comme partenaire exclusif, Raptor (regulatory associated protein of mTOR) alors qu'au niveau de mTORC-2, mTOR interagit avec Rictor (rapamycine insensitive companion of mTOR). L'utilisation de modèles génétiques murins où les cellules NK sont déficientes pour mTORC1 ou mTORC2 (Raptor  $\text{-/-}$  et Rictor  $\text{-/-}$  respectivement) a permis de démontrer l'implication de ces deux sous unités dans le contrôle de la maturation. Les cellules NK de souris déficientes pour Raptor (mTORC1) semblent être bloquées au stade immature, alors que le passage du stade DP au stade mature est altéré dans les souris déficientes pour Rictor (mTORC2) (Wang et al., 2018; Yang et al., 2018). mTORC1 et mTORC2 agissent donc de manière coordonnée pour permettre la maturation des cellules NK. Notamment, mTORC2 semble contrôler directement l'expression de Tbx21 (T-bet) et mTORC1 l'expression d'Eomes.

De manière intrinsèque, mTORC1 est régulé par le complexe TSC (TSC1/2, tuberous sclerosis complex) qui maintient son activateur direct, la petite protéine G Rheb, sous sa forme inactive Rheb-GDP. De façon remarquable, le complexe TSC est le point de convergence de plusieurs régulations : il est ainsi inhibé par Akt et activé par l'AMPK (AMP activated Kinase), senseur du niveau intracellulaire d'ATP, et par REDD-1 (regulated in development and DNA damage responses 1), senseur de l'oxygène cellulaire. En aval, mTORC-1 contrôle différents processus en régulant positivement la traduction, la synthèse lipidique, la glycolyse ou la biogenèse mitochondriale tout en inhibant l'autophagie. mTORC-2 est activé en aval de la PI3K par un mécanisme encore inconnu. Ce complexe induit alors la phosphorylation d'Akt sur la serine 473. Cette kinase phosphoryle les facteurs de transcription de la famille des Foxo provoquant leur exclusion du noyau. Un autre point de régulation est la relocalisation de mTORC1 à la surface du lysosome, qui est nécessaire à son activation notamment par les acides aminés (Sancak et al., 2010). Cependant dans les cellules NK, le rôle exact de acides aminés demeure peu caractérisé.

La voie de signalisation en aval de l'IL-15 et tout particulièrement la régulation de la voie mTOR par cette cytokine sont présentées en [Figure 17](#).

Les DC sont également des sources d'IL-18, connue pour agir en synergie avec l'IL-12 afin d'augmenter la production d'IFN- $\gamma$  par les cellules NK et leur capacité cytotoxique (Yu et al., 2001). Autre cytokine pro-inflammatoire, l'IL-21 semble pouvoir

potentialiser les fonctions effectrices des cellules NK. Les IFN de type I produits majoritairement par les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) vont également agir sur les cellules NK principalement de manière indirecte via notamment l'induction de la production d'IL-15 par les cellules myéloïdes (Marçais et al., 2013). Enfin, les cellules NK sont également sensibles aux effets immunosuppresseurs du TGF- $\beta$  et d'une manière qui semble indirecte à ceux de l'IL-10. En ce qui concerne le TGF- $\beta$ , notre équipe a récemment démontré qu'une partie de son effet immunosuppresseur reposait sur sa capacité à bloquer l'activation de mTOR par l'IL-15 dans les cellules NK (Viel et al., 2016).

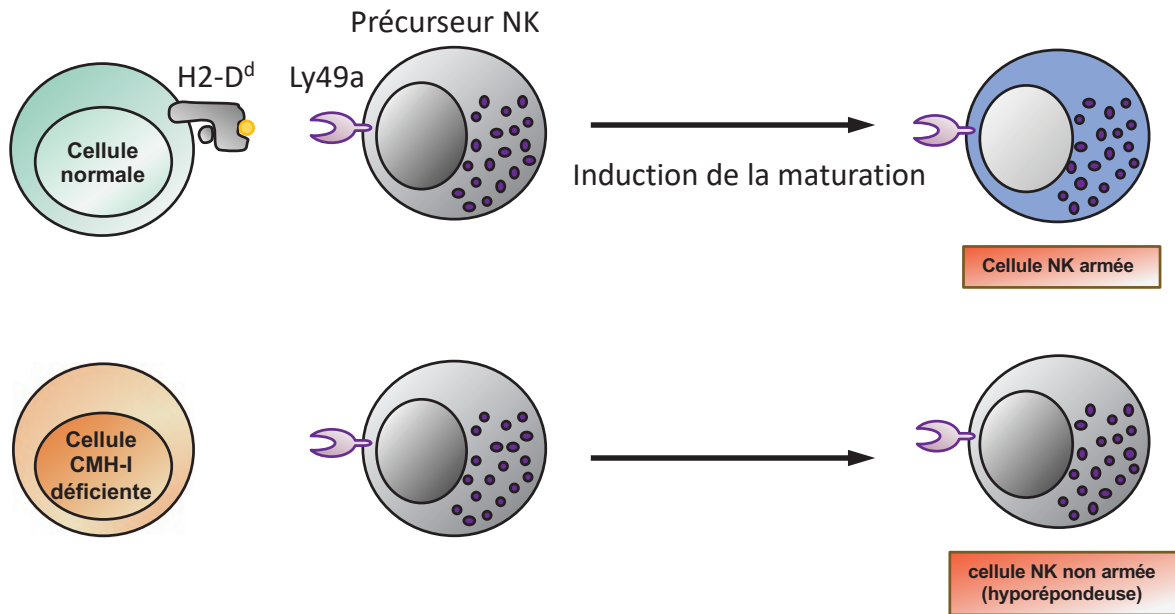
### 2.3.2 Régulation par le CMH de classe I

La réactivité de base des cellules NK est acquise au cours d'un processus nommé éducation, qui permet de générer des cellules NK tolérantes au soi. L'éducation ou « licensing » sous-entend un rôle positif des NKiR spécifiques des molécules du CMH-I (Anfossi et al., 2006; Kim et al., 2005) et des interactions avec leurs ligands. Différentes observations viennent soutenir cette hypothèse. Seules les cellules NK exprimant des NKiR engagés par le CMH-I sont réactives. C'est ce que l'on observe dans le modèle de souris déficientes pour l'expression du CMH de classe I (souris  $\beta$ 2-microbuline (B2m)  $\neg$  par exemple) dans lequel les cellules NK sont hypo-répondeuses, qu'elles expriment ou non des NKiR à leur surface (Joncker et al., 2010). De plus, des cellules NK exprimant des NKiR engagés mais mutées dans la voie de transduction du signal (SHP1  $\neg$  par exemple) sont également hypo-répondeuses (Viant et al., 2014). De la même façon, chez l'homme, les cellules NK de patients déficients pour TAP (transporteur de peptide) qui permet le transport des peptides vers l'intérieur du réticulum endoplasmique et donc l'expression du CMH-I chargé à la surface, ne sont pas réactives (Höglund et al., 1991; Zimmer et al., 1998).

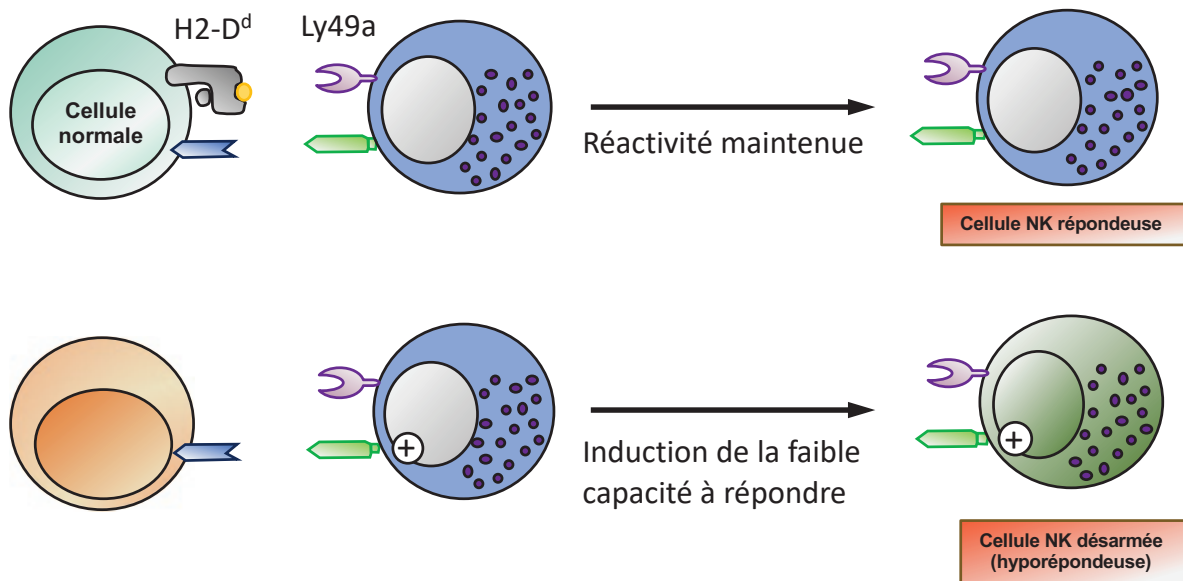
Deux écoles se sont longuement opposées quant aux mécanismes sous-jacents (revue de Höglund and Brodin, 2010; Raulet and Vance, 2006) (**Figure 18**). Certains sont partisans de la théorie de l'« armement » qui suggère que l'état fonctionnel des cellules NK est régulé de manière active ; alors que d'autres soutiennent la théorie du « désarmement ». Le premier modèle propose que les cellules NK vont être éduquées via l'engagement de leur NKiR spécifiques du CMH-I au cours de leur développement (Kim et al., 2005). Cette interaction engendrerait un signal qui augmenterait activement la réactivité cellulaire. En l'absence de ce signal, les cellules resteraient hypo-réactives et donc tolérantes au soi. La deuxième théorie suggère que c'est en fait l'état d'hypo-réponse qui est transmis de manière active : la réactivité est le statut par défaut et peut être perdue suite à la stimulation chronique des NKaR en absence d'opposition par les NKiR. Ce mécanisme ressemble à un processus d'anergie (Fernandez et al., 2005). Ici, c'est l'état « hypo-répondeur » qui



## A- Modèle de l'armement



## B- Modèle du désarmement



*Adapté de Raulet and Vance, 2006*

### Figure 18: Modèles de l'armement et du désarmement

La première théorie (modèle de l'armement) décrit un état hypo-répondeur des cellules NK en cas d'absence d'engagement des NKiR au cours du développement. En effet, la reconnaissance des molécules de CMH-I par les NKiR est ici nécessaire à la maturation des cellules NK, à l'acquisition du répertoire et à leur réactivité. Le deuxième modèle (modèle du désarmement) suggère que la réactivité est perdue suite à l'engagement chronique des NKaR en l'absence de signal inhibiteur.

est conféré de manière active. A ce jour, la théorie du « désarmement » est favorisée mais les mécanismes de ce processus permettant de préserver la capacité à répondre ne sont pas clairement identifiés. Au niveau sémantique, il est préférable d'éviter le terme « éducation » (ou licensing en anglais) car celui-ci donne une connotation positive suggérant un mécanisme actif, ce qui correspond plus au mécanisme de l'« armement ». Nous utiliserons donc préférentiellement par la suite les termes NK réactives/non réactives en remplacement des termes NK éduquées/non éduquées. Chez la souris C57BL/6, les récepteurs éduquants ont été définis comme Ly49C qui reconnaît H2Kb et CD94/NKG2A qui reconnaît la molécule semblable au CMH, Qa1 présentant un peptide dérivé du peptide signal de H2Db chez la souris (Joncker et al., 2010). On retrouve aussi Ly49I qui reconnaît H2Db/Kb. Chez l'homme, il semblerait que les récepteurs éduquants soient NKG2A et les KIR : KIR2DL1/2 et KIR3DL1 (Fauriat et al., 2010b). De même KIR2DS1 peut induire la perte de réactivité ce qui appuie le modèle du désarmement (Fauriat et al., 2010b). La réactivité paraît dépendre du nombre et de la force d'interactions entre le NKiR et son ligand, plus la force d'interaction est forte et plus la réactivité augmente (Johansson et al., 2005). Par la suite, la plasticité de ce système a également été documentée via des expériences de transfert adoptif (Elliott et al., 2010; Joncker et al., 2010). Les cellules NK réactives perdent la capacité à produire de l'IFN- $\gamma$  lorsqu'elles sont transférées dans des hôtes B2m  $\neg$  et vice versa.

Concernant les mécanismes moléculaires permettant d'expliquer ces différences de réactivité, il a été montré que les cellules NK réactives sont caractérisées par un flux calcique plus important et par une activation plus importante de l'intégrine LFA-1 (Guia et al., 2011; Thomas et al., 2013). Qui plus est, Guia *et al.*, ont montré que l'engagement des NKiR permet de réguler de manière très fine l'organisation des NKaR à la membrane au niveau du réseau d'actine. La signalisation proximale et l'organisation des récepteurs à la membrane n'expliquaient que partiellement les différences observées et l'on ignorait le rhéostat moléculaire qui commande ces différences. Cependant, très récemment, notre groupe a montré que les cellules NK réactives présentent une activité plus élevée de mTOR (basale et suite à l'engagement des NKaR) et cela dans deux modèles 1- en comparant les cellules NK de souris sauvages et B2m  $\neg$  et 2- au sein de la population sauvage, où l'on observe une corrélation parfaite entre le niveau de réactivité et le niveau basal d'activation de

la voie mTOR (Marçais et al., 2017). Le blocage pharmacologique par la Torin2, un inhibiteur ciblant les deux complexes mTORC-1 et mTORC-2, rend les cellules NK hypo-répondeuses, diminue le flux calcique et l'activation de l'intégrine LFA-1 après stimulation des NKaR. Ces résultats confirment les données similaires obtenues dans le modèle génétique. mTOR apparaît donc comme essentielle au processus de réactivité et agit en tant que rhéostat en amplifiant le signal en aval des NKaR (Marçais et al., 2017).

### **2.3.3 Régulation par les métabolites**

La réponse immunitaire nécessite des modifications profondes au niveau cellulaire pour permettre aux cellules d'exercer leurs fonctions. Ces réarrangements passent notamment par une reprogrammation métabolique indispensable pour fournir l'énergie demandée.

L'élément essentiel permettant de répondre aux besoins énergétiques des cellules NK est le glucose. Celui-ci va être converti, par glycolyse dans le cytoplasme, en pyruvate qui va pouvoir être métabolisé ensuite dans la mitochondrie (revue de O'Brien and Finlay, 2019). Ceci va permettre de générer des molécules de NADPH qui alimentent la chaîne de transport des électrons et donc la phosphorylation oxydative (abrégée OXPHOS) pour générer des molécules d'ATP fournissant l'énergie nécessaire (O'Brien and Finlay, 2019).

Les voies de la glycolyse et de l'OXPHOS peuvent être mesurée par l'utilisation d'un appareil « Seahorse ». Cet appareil mesure les variations de pH du milieu extracellulaire. L'acidification du milieu, conséquence du relargage de lactate par les cellules, permet ainsi d'évaluer la glycolyse. De plus, les variations de la concentration en oxygène sont également analysées et rendent compte de la respiration des cellules (et donc du niveau d'OXPHOS). Des expériences utilisant cette technique démontrent que les cellules NK murines non activées (présentent de faibles taux de glycolyse et d'OXPHOS (Keppel et al., 2015). De courtes stimulations avec des cytokines (IL-15, IL-12/15, IL-12/18) ou avec des anticorps anti-NK1.1 ou anti-Ly49D n'induisent pas d'augmentation significative du métabolisme (Keppel et al., 2015). En revanche, des stimulations cytokiniques plus longues (de l'ordre de la

dizaine d'heures) amplifient la glycolyse et l'OXPPOS (Donnelly et al., 2014; Marçais et al., 2014). L'inhibition de l'une ou l'autre de ces voies conduit à la diminution des fonctions effectrices (cytotoxicité et production d'IFN- $\gamma$ ) (Keppel et al., 2015). Cette reprogrammation métabolique semble être tributaire de la kinase mTOR dont l'activation est requise pour l'augmentation de la glycolyse après une stimulation sur la nuit avec des cytokines (IL-12/18 et IL-15) (Donnelly et al., 2014; Marçais et al., 2014a). Le rôle des métabolites et notamment des acides aminés, dans la régulation de mTOR, nécessite une plus ample caractérisation. De même, le rôle d'autres métabolites courants tels que la glutamine ou les acides gras n'est pas clairement défini. Une étude a rapporté l'importance du facteur de transcription c-myc, dont l'expression dépend de l'import d'acides-aminés par le transporteur CD98 (SLC7A5) (Loftus et al., 2018).

Le pyruvate produit par glycolyse entre dans la mitochondrie et dans le cycle de Krebs (TCA). Cependant, au niveau du citrate, celui-ci sort du cycle de Krebs pour être exporté vers le cytoplasme via la navette citrate-malate (CMS) en échange de malate. Cet import/export implique notamment le transporteur Sclc25a1 (Assmann et al., 2017). Une fois dans le cytoplasme, le citrate est clivé en Acétyl CoA et OAA par l'enzyme ATP citrate lyase (ACLY) régénérant du malate et du NAD<sup>+</sup>. De manière contre-intuitive, il a été montré que les facteurs de transcription SREBP (pour Sterol regulatory element binding proteins) ne sont pas nécessaires pour leur rôle dans la synthèse lipidique mais qu'ils sont impliqués dans la régulation transcriptionnelles des effecteurs nécessaires au CMS (Sclc25a1 et ACLY) (Assmann et al., 2017).

Ce qui a été montré avec les cytokines est également vérifié d'un point de vue physiologique. En effet, l'infection avec le cytomégalovirus murin (MCMV) induit une augmentation de la masse mitochondriale, et l'augmentation de l'expression du transporteur de glucose (Glut-1), du récepteur de la transferrine (CD71) et de CD98 (O'Sullivan et al., 2015a).

## **3- Rôle protecteur des cellules NK**

### **3.1 Immunité anti-infectieuse**

Le rôle majeur des cellules NK dans le contrôle précoce des infections notamment virales (Bukowski et al., 1983) a été bien documenté, même si elles peuvent également répondre à d'autres types d'infections par des pathogènes intracellulaires (bactéries, parasites) et extracellulaires via des mécanismes indirects (revue de Horowitz et al., 2012). Plusieurs évidences soulignent un rôle important des cellules NK dans le contrôle du cytomégalo virus murin (MCMV), du virus de la grippe (Influenza), de l'herpès simplex virus (HSV) ou des flavivirus comme le virus de la Dengue. En effet, une plus grande sensibilité pour ces virus a été démontrée dans des souris déplétées en cellules NK (Bukowski et al., 1983; St John et al., 2011; Zhou et al., 2013).

Chez l'homme leur rôle a été mise en évidence pour l'élimination de cellules infectées par le virus de l'hépatite C (VHC) (Khakoo et al., 2004), de l'immunodéficience humaine (VIH) (Martin et al., 2002; Scott-Algara et al., 2003), d'Ebola (Warfield et al., 2004) et du virus de l'hépatite B (VHB) (Dunn et al., 2007).

#### **3.1.1 Cas des infections aiguës**

Les cellules NK appartiennent à l'immunité innée et leur réponse survient généralement dans les heures ou les jours qui suivent la primo-infection. Elles vont directement tuer les cellules infectées via leurs fonctions cytotoxiques et sécréter notamment de l'IFN- $\gamma$  et du TNF- $\alpha$  qui ont plusieurs rôles dans l'immunité. L'IFN- $\gamma$  a des effets pléiotropiques. Il contribue à augmenter l'expression des molécules de CMH à la surface des cellules infectées pour les rendre visibles et sensibles à la réponse T et favorise le développement de l'axe Th1. Il permet l'induction d'une multitude de gènes impliqués dans la réponse anti-virale et augmente l'expression de TRAIL sur les cellules cibles (Horowitz et al., 2012; Schroder et al., 2004). Il sur-

active d'autre part les macrophages et les DC. Le TNF- $\alpha$  est un autre médiateur de l'inflammation qui permet également d'amplifier la réponse immunitaire et peut induire l'apoptose des cellules cibles (Croft, 2009).

En contexte viral, l'activation des cellules NK peut se faire de deux manières : 1- indirecte via l'ADCC ou par les cytokines produites telles que l'IL-15, l'IL-12 et les IFN de type I, ou 2- directe par reconnaissance des cellules infectées. Cette deuxième voie d'activation passe par les mécanismes que nous avons décrits : détection du soi induit ou du soi manquant mais aussi par la reconnaissance directe de ligands microbiens.

Ainsi, les mécanismes de détection de l'absence du soi peuvent être impliqués dans la reconnaissance des cellules infectées puisque certains virus peuvent interférer avec l'expression du CMH-I à la surface (Petersen et al., 2003), mais pour de nombreux virus, les preuves formelles d'une lyse *in vivo* n'ont pas été apportées. Par ailleurs, une telle diminution de l'expression du CMH-I n'a été clairement mise en évidence que pour les herpès virus, certains adénovirus, le VIH et le virus de la grippe (Petersen et al., 2003). D'autres mécanismes entrent donc en jeu pour de nombreux autres virus. Pour certains, on assiste à la détection directe de ligands microbiens, on peut citer le cas du récepteur NKp46 qui interagit avec l'hémagglutinine virale du virus de la grippe (Mandelboim et al., 2001) ou encore Ly49H qui reconnaît directement m157, une protéine virale de MCMV. Cette interaction Ly49H-m157 est nécessaire et suffisante pour déclencher l'activation des cellules NK et l'élimination du virus (Daniels et al., 2001). Ceci est confirmé par l'utilisation de souris transgéniques pour l'expression de Ly49H. Les souris de souche Balb/c n'expriment pas le gène Ly49H et sont sensibles à MCMV mais deviennent résistantes lorsque l'on introduit l'expression de Ly49H (Lee et al., 2003). Chez l'homme, NKG2C peut également reconnaître spécifiquement des peptides du cytomégalovirus humain (HCMV) présenté par HLA-E. Cependant, ces cas bien décrits associant des couples récepteur-ligand viral restent rares. Pour la majorité des autres virus, aucune paire récepteur-ligand n'a été clairement identifiée.

Pour résumer, les relations hôte/virus sont établies sur une base dynamique, évolutive mais les stratégies d'évolution des deux camps demeurent mal comprises. Les virus ont-ils évolué de manière à être reconnus par les cellules NK ou le

répertoire des cellules NK évolue-t-il afin de reconnaître directement les différents virus ? Le bénéfice de cette évolution pour l'hôte est également méconnu. La reconnaissance par les cellules NK peut être bénéfique car elle empêche la réplication virale exacerbée mais également néfaste car elle diminue la réponse T en limitant la dose d'antigène ce qui peut conduire à la persistance du virus et à l'établissement de la chronicité. Nous verrons par la suite que le contrôle par les cellules NK peut être altéré en cas d'infections persistantes, chroniques. Enfin, l'évolution du répertoire des cellules NK a été évaluée par l'utilisation d'un hôte particulier, la Roussette égyptienne (Pavlovich et al., 2018). Cette espèce de chauve-souris constitue un réservoir pour de nombreux virus (qui persistent de manière asymptomatique) et constitue donc un modèle de choix pour étudier l'évolution du répertoire soumis aux virus. Les auteurs ont pu mettre en évidence chez cette espèce, l'existence d'un répertoire particulier, unique alors qu'il apparaît hautement conservé dans les autres espèces. Le répertoire pourrait donc s'adapter aux virus qu'il rencontre. Cette étude semble également suggérer que dans cet hôte particulier, les régulations des cellules NK sont spécifiques (Pavlovich et al., 2018).

### **3.1.2 Population de NK adaptatives**

La découverte de populations de NK dites adaptatives, qui sont définies par une adaptation du répertoire au cours de l'infection, est récente. Ces cellules seraient dotées de propriétés mémoires, normalement réservées aux cellules de l'immunité adaptative. Ce concept est essentiellement associé aux virus HCMV/MCMV.

Dans le modèle MCMV, les cellules NK qui expriment le récepteur Ly49H spécifique de l'antigène viral m157 prolifèrent vigoureusement lors de l'infection (Dokun et al., 2001). Dans ce système, on observe une phase de contraction similaire à ce qui se produit pour les lymphocytes T, suivie de l'établissement d'une population de NK « mémoires » ou « adaptatives » spécifiques de l'antigène et capables de se renouveler et de persister à long terme (Sun et al., 2009). Ces cellules présentent une signature transcriptionnelle unique (Sun et al., 2011) et des caractéristiques communes aux LT mémoires (expansion secondaire, meilleures fonctions effectrices testées *ex vivo*, protection plus efficace en cas de seconde rencontre avec l'antigène). Cependant, elles répondent moins bien en réponse à d'autres virus ou



lors de stimulations par les cytokines IL-12/18, soulignant ainsi une certaine spécialisation vis-à-vis de l'antigène primaire. Par analogie avec les LT, trois signaux nécessaires à leur génération ont été mis en évidence :

- 1- la reconnaissance de m157 par Ly49H (équivalent de la liaison du TCR avec un antigène spécifique)
- 2- un signal de co-stimulation activateur puisque l'importance de DNAM-1 par exemple ou de protéines adaptatrices (PKC $\epsilon$  ou Fyn) a été montrée (Nabekura et al., 2014) (équivalent du signal CD28-CD80/86)
- 3- un signal cytokinique, l'IL-12/18 et les interférons de type I produits lors de l'infection apparaissent comme essentiels à la génération des NK mémoires en induisant l'expression du facteur de transcription Zbtb32 qui favorise la prolifération en inhibant la voie apoptotique conduite par Blimp-1 (Beaulieu et al., 2014).

La différenciation en cellule mémoire semble être tributaire du mécanisme d'autophagie. L'autophagie permet ici, d'éliminer les mitochondries endommagées qui apparaissent dans les cellules NK effectrices et conduisent à l'apoptose et donc à la phase de contraction (O'Sullivan et al., 2015a). Puis, le maintien du réservoir de cellules mémoires à long terme semble être dépendant de l'IL-15 (Firth et al., 2013).

Cette propriété de « mémoire » a également été mise en évidence chez l'homme (O'Sullivan et al., 2015b). En effet, une population de cellules NK particulières, exprimant CD94/NKG2C est présente chez les individus infectés par le cytomégalovirus humain (HCMV) à une fréquence plus importante que chez les personnes séronégatives pour HCMV (Gumá et al., 2006). Cette expansion est causée par l'IL-12 et corrèle avec l'expression de CD57, un marqueur de maturation terminale. De même que les cellules NK mémoires chez la souris, ces cellules NK adaptatives présentent une réponse altérée aux cytokines IL-12/18 et une baisse des capacités cytotoxiques quand elles sont restimulées *ex vivo* (Schlums et al., 2015).

L'expansion des cellules NKG2C<sup>+</sup> est retrouvée dans d'autres types d'infections (HBV, HCV, HIV, Chikungunya) mais uniquement chez les individus ayant été infectés par HCMV précédemment. On peut alors se demander si cette propriété est restreinte aux CMV ou si elle est transposable à d'autres virus/pathogènes ou cas de cancer. Certaines études ont montré l'existence de cellules NK de type mémoire générées suite à la réponse aux haptènes (O'Leary et al., 2006) ou induites par



stimulation préalable avec des cytokines (IL-12/18/15) et pouvant persister chez l'hôte jusqu'à 12 semaines (Ni et al., 2012).

En conclusion, en dehors de NKG2C, aucun autre marqueur de cellules NK spécifiques d'un antigène n'a pu être mis en évidence et la contribution de ces cellules NK dites adaptatives au phénomène de mémoire immunitaire nécessite une plus ample clarification. Il serait par ailleurs fortement intéressant de déterminer si l'on peut mobiliser les cellules NK pour la vaccination.

### **3.1.3 Cas des infections chroniques**

Si le système immunitaire ne parvient pas à éliminer le virus, celui-ci peut persister chez l'hôte conduisant à une infection chronique.

La diversité du répertoire des cellules NK est également modifiée en cas d'infections chroniques telles que les infections par le VHB, le VHC ou le VIH. Le VHC, par exemple altère l'expression des récepteurs NKG2A, CD16, NKp46, NKG2D et DNAM-1 et modifie ainsi les différents sous-groupes de cellules NK (Strunz et al., 2018). De même, les individus infectés par le VIH présentent une sous-population de cellules NK particulière CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup> très faiblement cytotoxique (Mavilio et al., 2005).

De nombreuses études, qui seront détaillées dans la partie 4.3 de l'introduction de ce manuscrit, ont mis en évidence une perte de fonctionnalité des cellules NK au cours des infections chroniques sans que l'on sache s'il s'agit d'une cause ou d'une conséquence de la chronicité. Les moyens utilisés par ces virus pour impacter le répertoire des cellules NK et supprimer leur capacité fonctionnelle restent également incompris.

Parmi ces maladies chroniques, l'Hépatite B est très étudiée et va maintenant être développée. Cette infection présente une forme aiguë qui peut évoluer en forme chronique chez certains individus selon l'âge, l'état du système immunitaire, l'origine ethnique, ou encore la souche de virus.

L'Hépatite B est une infection qui se transmet par voie sanguine, par voie sexuelle ou à la naissance de la mère infectée à l'enfant. Cette maladie est responsable de 680 000 décès par an dans le monde (WHO, « disease burden and mortality

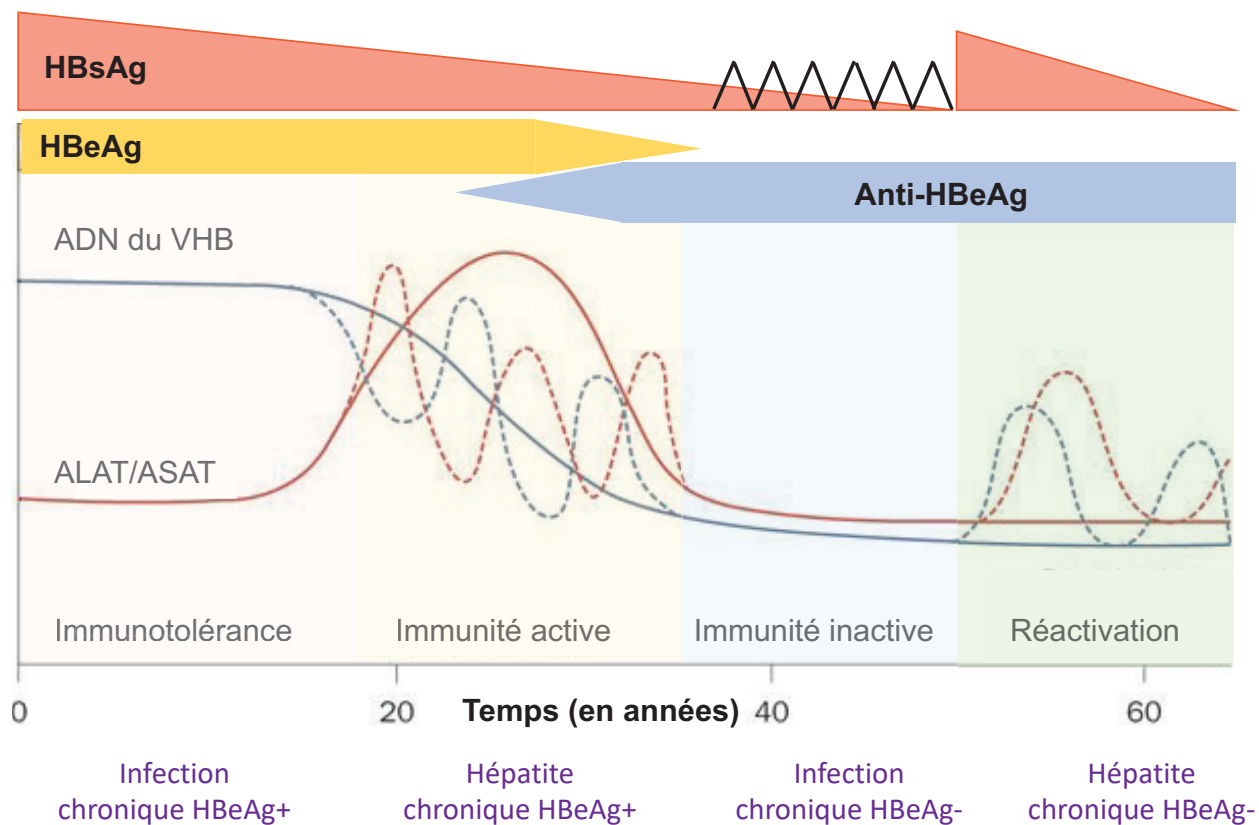
estimates », 2018). Cependant, le développement d'un vaccin préventif très efficace a permis de considérablement réduire le nombre d'individus atteints, notamment dans les pays occidentaux. Cependant, les zones de prévalence se situent majoritairement en Afrique subsaharienne et en Asie, zones où le vaccin est moins accessible.

L'agent responsable de cette maladie est le VHB, un adénovirus membre de la famille des *Hepadnaviridae* (Seeger and Mason, 2000).

C'est un oncovirus hépatotropique de 3,2 Kb partiellement double-brin qui infecte essentiellement l'homme, les primates non humains et la marmotte. Le génome du virus code pour quatre gènes : C, P, S et X (Seeger and Mason, 2000). Le gène C code la protéine de capsidite ou « core » nommée HBcAg. Un codon initiateur en amont permet la synthèse de la protéine pré-C qui est ensuite clivée pour donner la protéine HBeAg, protéine sécrétée et retrouvée dans le sang des patients. Le gène P code l'ADN polymérase et la protéine de surface HBsAg est codée par le gène S. Enfin, le gène X code la protéine HBxAg aux fonctions mal comprises. Certaines études ont souligné son potentiel oncogénique (Hussain et al., 2007). Dans la littérature, de nombreuses études ont décrit le rôle des protéines sécrétées HBsAg et HBeAg dans l'inhibition de la réponse immunitaire (Faure-Dupuy et al., 2017; Martinet et al., 2012; Tout et al., 2018; Vincent et al., 2011). Concernant la physiopathologie du virus, les dommages hépatiques rencontrés chez les patients résultent de la réponse immunitaire à l'encontre des cellules infectées et ne sont pas causés par le cycle viral puisque le VHB est un virus non cytopathique.

Dans 90 à 95% des cas, le système immunitaire élimine rapidement le virus. Cependant 5 à 10% des individus atteints ne parviennent pas à éradiquer l'infection qui évolue alors vers une forme chronique (CHB). Dans le monde, 290 millions de personnes sont porteurs chroniques du virus (Plummer et al., 2016). Suite à la réactivation périodique du virus, ces patients risquent de développer une cirrhose qui peut évoluer en carcinome hépatocellulaire.

Les états chroniques de la maladie sont sous-divisés en quatre phases (Figure 19) selon les nouvelles règles de classification de l'association européenne pour les études du foie (EASL pour European Association for the Study of the Liver).



Adapté de (Yapali et al., 2014)

### Figure 19: Phases chroniques de l'infection au VHB

Les patients chroniquement infectés par le VHB peuvent être classés selon la phase de l'infection.

- 1- Infection chronique HBeAg (+) : anciennement nommée phase d'immunotolérance (IT). Cette phase est caractérisée par l'absence de réponse immunitaire, c'est à dire par une charge virale importante (HBV DNA load), pas de dommages hépatiques (niveaux d'ALAT et ASAT faibles). Cette phase est asymptomatique.
- 2- Hépatite chronique HBeAg (+) : anciennement nommée phase d'immunité active (IA). Lors de cette phase, une immunité se met en place permettant alors de diminuer la charge virale qui reste tout de même importante. Les taux d'ALAT et d'ASAT produits sont donc importants lors de cette phase.
- 3- Infection chronique HBeAg (-) : anciennement nommée phase d'immunité inactive (IN). Ici, la charge virale redevient faible, les taux d'ALAT et ASAT diminuent également. Les patients subissent une séroconversion : l'antigène HBe est absent et on trouve des anticorps anti-HBeAg chez ces patients.
- 4- Hépatite chronique HBeAg (-) : anciennement nommée phase de réactivation : Les porteurs chroniques inactifs peuvent subir des cycles de réactivation du virus qui s'accompagne d'une réactivation de la réponse immunitaire. Cette phase est donc définie par une virémie élevée ainsi que des taux d'ALAT et ASAT importants. La probabilité de rémission est très faible.

Effets sur les cellules NK	Echantillons (N)	Bibliographie
↑ fréquence des cellules NK ↑ phénotype activée: CD69+ NKG2D+ ↑ production d'IFN $\gamma$ et cytotoxicité	Infection aigüe (étude longitudinale au cours de la période d'incubation) 2 AHB 3 HD ALAT: 25 U/l	<a href="#">Fiscaro et al 2009 Gut</a>
↑ CD56 <sup>bright</sup> ↓ phénotype inhibé (Diminution de CD244, CD161, CD25) ↓ fonctionnalité des cellules NK (cytotoxicité et production de cytokine) après stimulation par de l'IFN $\alpha$	10 AHB 32 HD ALAT: 1838 (28-4176)	<a href="#">Luneman et al, Journal of Infectious Diseases 2014</a>
↑ NKaR (Nkp30, Nkp44, Nkp46, NKG2C, TRAIL mais pas de NKG2D et de CD69) ↑ fonctionnalité après une stimulation par 12/18 ou par des K562 corrélation avec les niveaux d'ALAT et anti corrélation avec la charge virale ↑ production de cytokines pro-inflammatoires (IL-12, IFN $\gamma$ , MIP1 $\beta$ ) ↑ CD56 <sup>bright</sup> , CD38 and HLA-DR ↓ CD56 <sup>dim</sup> , % cellules NK totales circulantes ↓ NKiR (NKG2A et CD158a et b (KIR2DL1-KIR2DL2/3))	21 AHB 16 HD ALAT: 974 (88-2216)	<a href="#">Zhao et al Plos One 2012</a>
↓ production de cytokines innées (IFN $\gamma$ , IL-15, IFN type I) ↓ pourcentage de NK CD69+, production d'IFN $\gamma$ après une stimulation par IL-12/18 ↑ IL-10 serum levels	21 AHB 27 HD ALAT: 1683	<a href="#">Dunn et al, Gastroenterology, 2009</a>

AHB: Hépatite B aigüe, HD: healthy donor (contrôle sain), ALAT: alanine aminotransferase,

### Tableau 1: Principales études sur les cellules NK et l'Hépatite B aigüe

Globalement, la plupart des études suggèrent que les cellules NK participent au contrôle précoce de l'infection. Cependant ces études sont contradictoires ; certaines montrent une activation des cellules NK alors que d'autres révèlent la perte de fonction des cellules NK. Ces différences peuvent être attribuées au nombre d'individus étudiés, à leur origine ethnique et au moment du prélèvement car l'infection aigüe passe par une phase d'incubation et tous ne présentent pas les mêmes niveaux d'inflammation du foie (*cf* niveau ALT). Le rôle des NK et l'effet du virus sur ces cellules ne sont donc que très peu compris à ce jour. Il en est de même en contexte chronique (Tableau 2).

Les critères utilisés pour la classification sont : la virémie, la présence de l'antigène HBe et les taux sanguins des enzymes hépatiques alanine amino-transférase (ALAT) et aspartate amino-transférase (ASAT) sécrétées en cas de dommages du foie (Lampertico et al., 2017).

Concernant les cellules NK, plusieurs études soulignent une perte de fonction des cellules NK chez les patients chroniquement infectés (Oliviero et al., 2009; Peppia et al., 2010; Sun et al., 2015; Tjwa et al., 2011) mais l'absence de bon modèle murin ralentit la compréhension des mécanismes sous-jacents. Ceux-ci ont donc fait l'objet d'une étude parallèle à mon projet de thèse qui sera présentée dans ce manuscrit. Les différentes études analysant le phénotype et la fonctionnalité des cellules NK chez les patients atteints d'Hépatite B aiguë et chronique sont résumées dans les **Tableaux 1 et 2** respectivement.

Effets sur les cellules NK	Echantillons (N)	Bibliographie
<p>Pas de différence dans la fréquence et la distribution des cellules NK</p> <p>↑ NKG2A, HLA-DR</p> <p>↓ CD16, Nkp30, CD69 et de la <b>production d'IFN<math>\gamma</math></b> après stimulation par IL-12/18</p> <p>Corrélation avec la charge virale</p>	<p>40 CHB 25 HD</p> <p>ALAT: 60 (34-145)</p>	<p><a href="#">Tiwa et al, Journal of Hepatology 2011</a></p>
<p>↑ NKG2A dans la phase IA</p> <p>↓ NKG2A dans la phase IN</p> <p>Le blocage de NKG2A augmente la cytotoxicité des cellules NK</p>	<p>42 IA 31 IN 35 HD</p> <p>ALAT: 81, IA: 148, IN:32</p>	<p><a href="#">Li et al, Gastroenterology 2013</a></p>
<p>↓ cellules NK circulants</p> <p>↑ dégranulation contre les cibles P815 (mais pas contre des K562)</p> <p><b>Faible production de cytokines</b></p>	<p>22 CHB 30 HD</p> <p>ALAT: 50,5 (13-291)</p>	<p><a href="#">Oliviero et al, Gastroenterology 2009</a></p>
<p>↑ Expression Tim3</p> <p>Corrélation avec les niveaux d'ALAT</p> <p>Le blocage de Tim-3 augmente la cytotoxicité des cellules NK</p>	<p>76 CHB 38 HD</p> <p>18 atteints de maladies du foie gras</p> <p>ALAT: 278 +/- 48</p>	<p><a href="#">Ju et al, Journal of Hepatology 2010</a></p>
<p>↑ Expression de PD-1 et HLA-E sur les cellules NK</p> <p>↑ Production d'IL-10</p> <p>Des cellules NK suppressives sont induites par les monocytes</p> <p>Les cellules NK suppressives inhibent les lymphocytes T</p>	<p>35 CHB (Hbe+) 35 HD</p> <p>ALAT: 28 +/-15</p>	<p><a href="#">Li et al, Gut 2017</a></p>
<p>↑ CD56<sup>bright</sup>, TRAIL</p> <p>↓ <b>production d'IFN<math>\gamma</math> et de TNFa</b></p> <p>Pas de différence concernant la dégranulation</p>	<p>29 high ALAT (112: 57-604) 35 low ALAT (34: 10-47) 31 HD</p> <p>+ 22 treated (lamivudine + adefovir)</p>	<p><a href="#">Peppia et al, Plos Pathogens 2010</a></p>
<p>↓ Fréquence des cellules NK, expression de NKG2D, 2B4 et DAP10/SAP</p> <p>↓ <b>IFN<math>\gamma</math></b> et de la cytotoxicité (IT en particulier), flux calcique</p> <p>Corrélation avec les niveaux de TGF-<math>\beta</math> dans le sérum</p> <p>TGF-<math>\beta</math> cause l'arrêt du cycle</p> <p><i>Le blocage du TGF-<math>\beta</math> restaure l'expression de NKG2D et de 2B4</i></p>	<p>65 IT ( ALT: 22 +/- 1) 48 IA (ALT: 268 +/- 46) 41 IN (ALT: 21 +/- 1) 95 HD</p>	<p><a href="#">Sun et al, Plos Pathogens 2012</a></p>

IT: Immunotolérants, IA: immunité active, IN: immunité inactive, , CHB: Hépatite B chronique, HD: healthy donor (contrôle sain), ALAT: alanine aminotransferase,

## Tableau 2: Principales études sur les cellules NK et l'Hépatite B chronique

Les études menées en contexte chronique démontrent pour la plupart une perte de la capacité à produire de l'IFN- $\gamma$ . En revanche, il est plus difficile de mettre en évidence un phénotype commun, ou des mécanismes globaux car elles peuvent elles aussi être contradictoires et dépendent notamment de la phase analysée, du nombre d'individus et de leur origine ethnique.

### 3.2.1 Concepts d'immunosurveillance et 3E

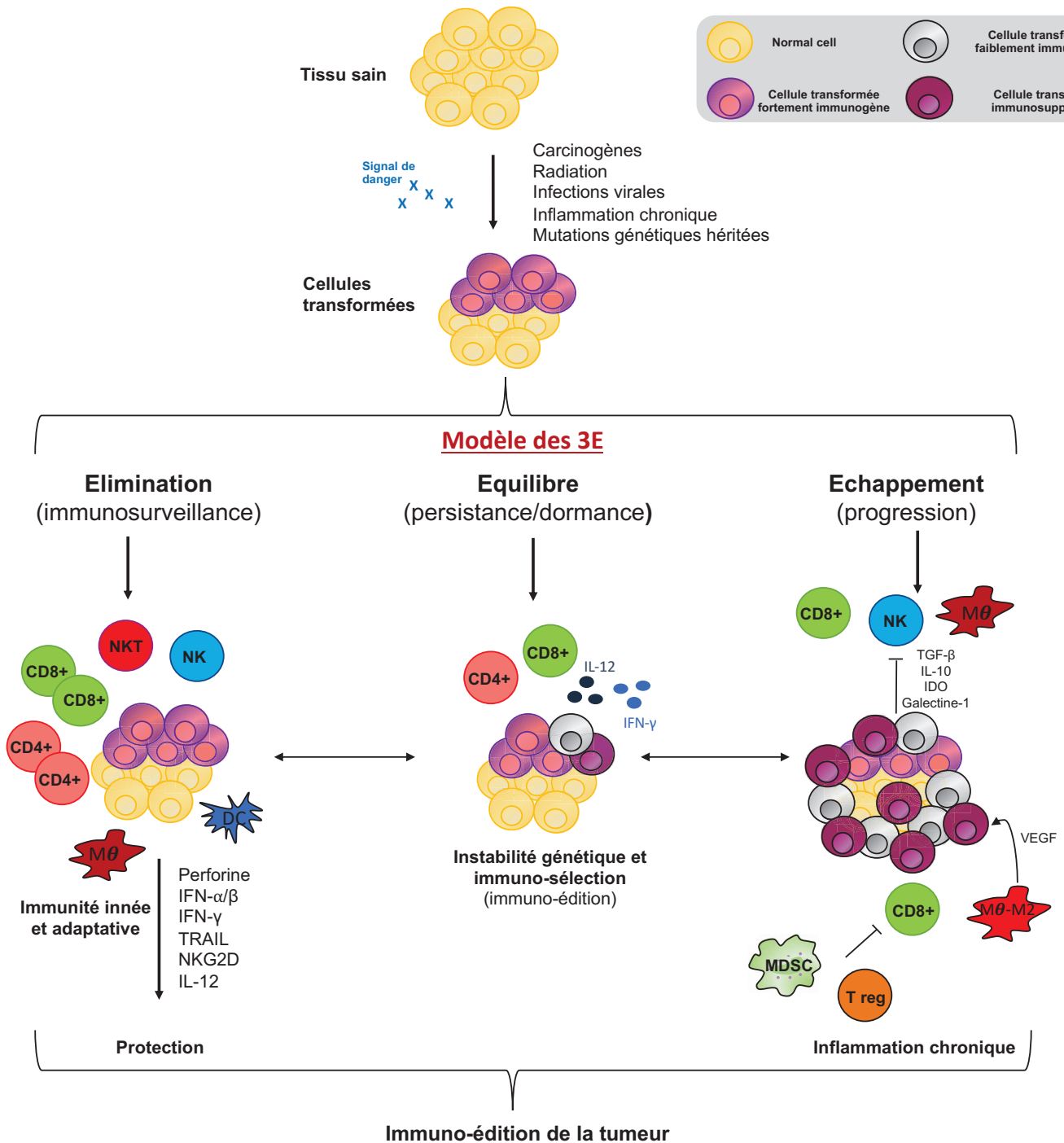
Le concept d'immunosurveillance des tumeurs fut formulé au début du XX<sup>e</sup> siècle par Paul Ehrlich (Ehrlich et al. 1909) mais fut largement controversé par la suite du fait de l'absence de preuves expérimentales définitives. Ainsi ce n'est que dans les années 1970 - 1980 que cette hypothèse a pu être formellement vérifiée.

Plusieurs démonstrations viennent maintenant soutenir cette théorie de l'immunosurveillance. Premièrement, les animaux immuno-déficients telles que les souris « nude » forment plus de fibrosarcomes que les animaux sauvages, suite à l'injection d'agent chimique carcinogène, tel que le methylcholanthrene (MCA) (Engel et al., 1996). D'autres part, des expériences de transplantations de tumeurs, montrent que la pousse de ces lignées est plus rapide et plus importante dans des souris traitées avec un anticorps neutralisant l'IFN- $\gamma$ , comparée aux animaux non traités (Dighe et al., 1994). Ceci fut confirmé par la suite en utilisant des souris insensibles à l'IFN- $\gamma$  (Kaplan et al., 1998). Les souris déficientes pour le gène de la perforine (*Prf1*<sup>-/-</sup>) sont également plus sensibles au développement de tumeurs spontanées ou chimiquement induites que leurs homologues sauvages (Street et al., 2001). Enfin, les souris RAG-2 (recombination activating gene) déficientes (*RAG-1* ou *RAG-2*<sup>-/-</sup>) développent plus de tumeurs suite à un traitement MCA (Shankaran et al., 2001). L'absence de l'enzyme RAG, exprimée spécifiquement par le compartiment lymphocytaire, empêche le réarrangement génique permettant de générer les récepteurs TCR et BCR. Ces souris déficientes ne possèdent donc ni lymphocytes T, ni lymphocytes B, ni NKT. Le rôle de l'immunité innée est donc ici clairement démontré. Le système immunitaire, et plus particulièrement la branche lymphocytaire, est donc nécessaire à la reconnaissance et à l'élimination des tumeurs qui se développent. Chez l'homme, de nombreuses données provenant d'études longitudinales soutiennent également l'existence de l'immuno-surveillance des tumeurs et démontrent que les individus présentant des immuno-déficiences sont plus à risque de développer un cancer (Boshoff and Weiss, 2002; Gatti and Good, 1971). A cela s'ajoutent plusieurs études corrélatives mettant en relation le nombre de lymphocytes infiltrant la tumeur et l'amélioration de la survie des patients dans le cas de mélanome (Clark et al., 1989), cancer du sein (Rilke et al., 1991), de

la vessie (Lipponen et al., 1992), du colon (Naito et al., 1998), de la prostate (Epstein and Fatti, 1976), de l'ovaire (Deligdisch et al., 1982), du rectum (Jass, 1986) et du neuroblastome (Palma et al., 1978).

Paradoxalement, bien que le système immunitaire soit essentiel pour contrôler les néoplasies qui peuvent survenir, il exerce une pression de sélection qui modifie la tumeur : c'est le concept d'« immuno-édition » (ou « immunoediting » en anglais). Ce processus dynamique va conduire à la sélection de variants plus agressifs au sein des cellules tumorales. En effet, par la suite, une succession d'études clés a permis de mettre en évidence le paradoxe du concept d'immunosurveillance : les tumeurs qui se développent en présence d'un système immunitaire compétent (souris sauvages) sont plus agressives. Dans une première étude, des expériences de réimplantation dans des souris naïves de tumeurs induites par le MCA ont montré que les tumeurs provenant de souris RAG-2  $\gamma\gamma$  sont plus immunogènes et ainsi mieux rejetées que les tumeurs provenant de souris sauvages (Shankaran et al., 2001). Ces résultats seront ensuite corroborés par d'autres études utilisant des souris nude ou présentant un syndrome d'immuno-déficience combinée sévère (SCID) (Vesely et al., 2011). De même, l'immunité lymphocytaire innée joue également un rôle important dans l'immuno-édition, comme cela a pu être démontré par comparaison de la pousse de tumeurs (sarcomes induits par le MCA) dans des souris RAG-2  $\gamma\gamma$  et RAG-2  $\gamma\gamma$  x  $\gamma\gamma$  (O'Sullivan et al., 2012). Ces dernières présentent une déficience complète en lymphocytes (compartiment adaptatif et inné). Ici, l'immuno-édition nécessite la présence de macrophages de type M1, de cellules NK, d'IFN- $\gamma$  et de  $\gamma\gamma$  (CD132, sous-unité  $\gamma$  du récepteur à l'IL-2/15). En 2002, pour décrire les interactions entre le système immunitaire et la tumeur, Dunn *et al.*, énoncent les 3E du processus d'immuno-édition (Dunn et al., 2002). : Élimination, Équilibre et Échappement qui sont résumés en **Figure 20**. L'équilibre décrit la phase de lutte continue entre le système immunitaire et la tumeur. Seuls les variants résistants survivent et échappent au système immunitaire.





Adapté de Vesely et al., 2011

### Figure 20: Concept des 3E

Les cellules transformées qui se développent chez un individu sont éliminées par le système immunitaire inné et adaptatif. Cela permet de protéger l'hôte et d'atteindre une phase d'équilibre où la pousse tumorale est contrôlée. Cependant, ce contrôle exerce sur les cellules tumorales, une pression de sélection conduisant à des instabilités génétiques qui vont ainsi permettre de sélectionner des variants plus agressifs capables d'échapper aux cellules immunitaires et de progresser. Cette phase génère également une forte inflammation qui contribue également à l'immuno-édition de la tumeur.

### 3.2.2 Rôle des cellules NK dans l'immuno-surveillance

Comme nous venons de le voir, l'immuno-surveillance de la tumeur exerce une pression de sélection sur les cellules tumorales qui va conduire à l'établissement de nouvelles mutations au sein des cellules tumorales. Notamment, beaucoup de tumeurs diminuent, voire perdent l'expression des molécules de CMH-I et échappent ainsi à la réponse T (Garrido and Algarra, 2001; Garrido et al., 1997). La perte d'allèle spécifique HLA-1 (qui code pour les gènes du CMH-I) a été analysée et mise en évidence dans des échantillons provenant de biopsies de nombreux types de cancers tels que de mélanomes (Marincola et al., 1994), de cancer du sein (Park et al., 2019), de cancer du poumon (McGranahan et al., 2017), de cancer de l'ovaire (Norell et al., 2006). Contrepartie de cet échappement aux réponse lymphocytaires T, les tumeurs ayant perdu l'expression du CMH-I deviennent des cibles pour les cellules NK (théorie de l'absence du soi) (Algarra et al., 2004; Stewart and Abrams, 2008).

En outre, les cellules tumorales expriment également des ligands des récepteurs activateurs présents à la surface des cellules NK (théorie du soi-induit) tels que des ligands des récepteurs NKG2D (Gasser et al., 2005), ou des NCR (NKp30, NKp46, NKp44) (Moretta et al., 2001b), ou encore de DNAM-1 (Lakshmikanth et al., 2009). En effet, le processus de transformation oncogénique induit une réponse cellulaire au stress, mettant notamment en jeu la réponse aux dommages de l'ADN et le processus de sénescence. Ces deux processus sont connus pour conduire à l'expression de ligands stimulateurs des cellules NK, essentiellement les ligands de NKG2D (Chan et al., 2014).

Les cellules NK peuvent donc reconnaître et éliminer directement les cellules tumorales via le système Perforine/Granzyme, ou en induisant l'apoptose des cellules cibles via le TNF- $\alpha$  ou les systèmes Fas/FasL et TRAIL/TRAILR. Cependant, elles vont également jouer un rôle indirect via la production d'IFN- $\gamma$  qui va induire l'expression des molécules de CMH-I par la tumeur et va donc augmenter l'immunogénicité des cellules tumorales mais aussi déclencher la réponse adaptative. De plus, les cellules NK vont aider au recrutement et à la maturation des DC (Böttcher et al., 2018).

## a- Cas des tumeurs primaires solides et hématologiques

Initialement, les premières démonstrations du rôle des cellules NK dans la lyse des cellules tumorales ont été faite *in vitro* et sont, en fait, à l'origine de leur découverte (Herberman et al., 1975; Kiessling et al., 1975a). En effet, comme rapporté au début de ce manuscrit, les cellules NK présentent la capacité de lyser *in vitro* des cellules de type tumorales, sans activation préalable et sans reconnaissance d'un néo-antigène. Ce concept de reconnaissance des cellules n'exprimant pas le CMH de classe I (H-2 chez la souris) fut illustré par la suite *in vivo* (Ljunggren, 1985).

Puis *in vivo*, le rôle des NK dans le rejet tumoral a été tout d'abord démontré chez la souris et le rat par l'utilisation de différents modèles de tumeurs transplantables ou spontanées (Barlozzari et al., 1983; Gorelik et al., 1984; Riccardi et al., 1980). L'étude la plus précoce remonte aux années 1980 et démontre l'existence d'une corrélation entre l'activité cytotoxique *in vitro* des cellules NK face à différentes lignées tumorales et la lyse *in vivo* de ces mêmes lignées tumorales marquées avec l'iode 125 deoxyuridine ( $^{125}\text{I}$  dUrd). De plus, l'élimination *in vivo* des cellules tumorales sensibles aux NK est améliorée par l'utilisation de traitements pharmacologiques activant les cellules NK tels que l'acide polyinosinique-polycytidylique (poly I:C) (Riccardi et al., 1980). La démonstration plus formelle fut établie dans des modèles de souris déplétées en cellules NK via l'utilisation d'un anti-asialo GM-1 (Barlozzari et al., 1983) ou d'un anti-NK1.1 (clone PK136) (Smyth et al., 2000a) bien que leur spécificité n'est pas parfaite. Le rôle des NK a également été évalué dans des souris transgéniques présentant une perte drastique du nombre de cellules NK due à l'expression du récepteur inhibiteur Ly49A par l'ensemble des cellules NK (Kim et al., 2000). Dans ce modèle, les auteurs démontrent que la pousse des tumeurs B16 et RMA-S est plus importante que dans les souris sauvages. Autre preuve plus indirecte, les cas de transplantations hématopoïétiques haplo-identiques, (c'est à dire lorsque les patients receveurs présentent une semi compatibilité HLA avec les KIR du donneurs) permettraient d'éviter les rechutes de patients leucémiques via les cellules NK (Ruggeri et al., 2002). Ceci indique un effet puissant des cellules NK contre les cellules leucémiques du receveur. Enfin, l'utilisation de souris déficientes pour certains gènes essentiels à la fonction NK tels

que la Perforine (Smyth et al., 2000b), le TNF- $\alpha$  (Smyth et al., 1998), le récepteur TRAIL (Finnberg et al., 2008) ou pour des molécules impliquées dans la reconnaissance des cibles comme NKp46 (Halfteck et al., 2009), NKG2D (Guerra et al., 2008), et DNAM-1 (Gilfillan et al., 2008) confirment les résultats précédents.

Chez l'homme, il est plus difficile de démontrer leur rôle. Peu d'immunodéficiences sont restreintes aux cellules NK, ce qui ne permet pas d'établir un lien causal fort avec l'apparition de cancer étant donnée la faiblesse des cohortes mises en jeu. La plupart des études sont, de ce fait, uniquement corrélatives. Ainsi, une association positive a pu être mise en évidence entre la régression du cancer et le nombre de cellules NK infiltrées (marquages CD57 sur des biopsies provenant de différents types de cancer : cancer colorectal (Coca et al., 1997), gastrique (Ishigami et al., 2000), ou du poumon (Villegas et al., 2002)). L'analyse de transcrits témoignant de la présence de cellules NK (comme par exemple NKp46 ou Perforine) dans des biopsies provenant de tumeurs du rein a également permis de corrélérer positivement le nombre de cellules NK dans la tumeur et un bon pronostic (Eckl et al., 2012). Cependant, ces transcrits ne sont pas forcément spécifiques des cellules NK. Enfin, une autre étude démontre l'association entre une faible capacité cytotoxique des cellules NK du sang périphérique (testée *ex vivo*) et l'incidence des cancers (Imai et al., 2000). A l'inverse, l'analyse de 457 patients atteints d'immunodéficiences variables communes et présentant une forte lymphopénie a été effectuée. Ces patients ont été classés selon leur taux de cellules NK sanguines mais aucune augmentation de l'incidence de néoplasies chez les patients présentant un taux faible de cellules NK n'a pu être mise en évidence (Ebbo et al., 2016). Les cellules NK ont donc la capacité de tuer des cellules tumorales mais leur rôle exact dans le contrôle des tumeurs primaires *in vivo* requiert une plus ample caractérisation.

## **b- Cas des métastases**

Le rôle des NK dans le contrôle des métastases a également été rapporté, en mettant en évidence, par exemple, l'importance de NKp46 dans ce contexte (Glasner

et al., 2012, 2018). Dans un modèle génétique d'absence de cellules NK, les souris déficientes pour le gène « myeloid cell leukaemia sequence 1 » (Mcl1<sup>-/-</sup>) accumulent très rapidement des métastases dans les organes vitaux tels que le poumon, le foie, les os après injection de cellules B16 (Sathe et al., 2014). Les souris SCID  $\times \gamma c^{-/-}$  sont également plus sensibles que les souris SCID au développement de métastases suivant l'implantation d'une tumeur mammaire (Dewan et al., 2005). A contrario, dans un modèle où les cellules NK sont retenues dans le poumon (souris invalidées pour le gène codant pour le récepteur à la sphingosine 1 phosphate (Spns2<sup>-/-</sup>)), l'établissement de métastases dans cet organe suite à l'injection de cellules B16F10 est moindre (van der Weyden et al., 2017). L'expression augmentée de certains ligands de NKG2D (MICA/B, ULBP1-3) sur les cellules tumorales au cours de la transition épithélio-mésenchymateuse liée au processus métastatique, participe aussi à l'activation des NK (López-Soto et al., 2013).

Concernant le rôle anti-métastatique chez l'homme, une population spécifique de NK CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>+</sup> ayant un potentiel cytotoxique important vis-à-vis des cellules métastatiques a également été décrite dans les ganglions des patients atteints d'un mélanome (Messaoudene et al., 2014). Le nombre de NK circulants et infiltrants la tumeur, leur capacité cytotoxique et l'expression forte de récepteurs activateurs sont associés avec une plus faible accumulation de métastases (López-Soto et al., 2017). Enfin, une meilleure survie de patients atteints de mélanomes métastatiques est clairement associée à l'infiltration NK au niveau des métastases (Cursons et al., 2019).

Globalement, la littérature à la fois pré-clinique et clinique démontre un puissant potentiel anti-métastatique mais un moindre rôle dans le contrôle des tumeurs solides primaires où le nombre de NK est finalement un facteur moins important pour le pronostic comparé à l'infiltration CD8 (Senovilla et al., 2012).

En revanche, de nombreuses tumeurs à des stades avancés n'expriment pas le CMH de classe I. Ceci signifie que, bien qu'elles soient sensibles aux cellules NK, elles échappent à leur vigilance. Cependant, les mécanismes conduisant à la non-réponse des cellules NK demeurent peu caractérisés et furent l'objet de nombreuses études que nous allons maintenant détailler.

## **4- Échappement à la réponse NK**

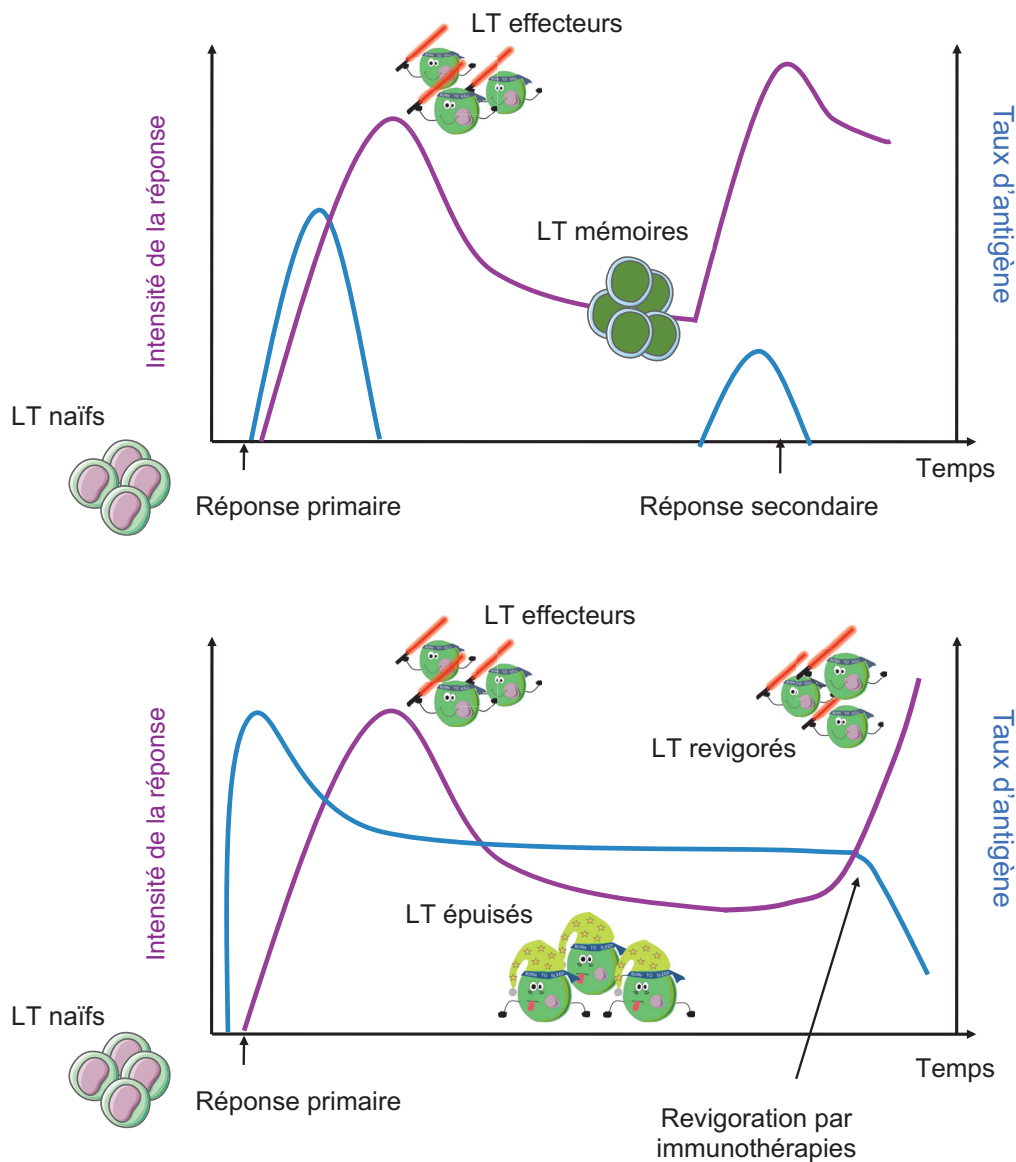
### **4.1 Définition du concept d'épuisement**

L'épuisement des cellules immunitaires est un état acquis en contexte de stimulation chronique et caractérisé par la perte des capacités effectrices, la conséquence étant une non-réponse plus ou moins profonde vis-à-vis du signal ayant induit l'épuisement (Joyce and Fearon, 2015; Wherry, 2011). Cet état d'hypo-réactivité a été décrit pour les lymphocytes B (Moir et al., 2008), les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (Crawford et al., 2014), les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (Wherry, 2011) et, plus récemment, les cellules NK (Bi and Tian, 2017). L'utilisation du terme « épuisement » est actuellement controversée bien qu'acceptée pour les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> en contexte d'infections virales chroniques. Mis à part ce terme, on peut retrouver les dénominations « anergie », « tolérance », « désensibilisation », « dysfonction », ou encore « hypo-réponse » utilisées pour d'autres contextes ou types cellulaires.

L'étude des mécanismes conduisant à ce processus constitue un champ de recherche grandissant dont le but final est le développement de nouvelles thérapies pour revigorer ces cellules épuisées. Lorsque j'ai débuté ma thèse en Novembre 2015, peu de données existaient dans la littérature sur cette thématique pour les cellules NK. En revanche, les mécanismes sous-jacents étaient mieux décrits pour les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques et ont constitué la base de nos hypothèses ; c'est pourquoi nous allons maintenant les détailler.

### **4.2 Parallèle avec l'épuisement des LT CD8<sup>+</sup>**

Le Pr. Rafi Ahmed et son groupe furent les premiers à décrire l'épuisement des LT CD8<sup>+</sup> dans des souris infectées chroniquement par le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV) (Zajac et al., 1998). Il existe deux souches virales, nommées



Adapté de Pauken and Wherry, 2015

### Figure 21: Réponse T en contexte aigu et chronique

Lorsque les lymphocytes T naïfs rencontrent un antigène, deux situations peuvent survenir. En contexte de stimulation aiguë, les lymphocytes T se différencient rapidement en lymphocytes effecteurs capables d'éliminer l'antigène. Il se produit ensuite une phase de contraction qui réduit le réservoir de lymphocytes T spécifiques de l'antigène et qui génère des lymphocytes mémoires capables de répondre plus efficacement et plus rapidement en cas de rencontre ultérieure avec le même antigène. En revanche, en cas de stimulation chronique, les lymphocytes T effecteurs ne parviennent pas à éliminer l'antigène et présentent un phénotype que l'on peut qualifier d'« épuisé ». La recherche actuelle vise à rétablir leurs fonctions par l'utilisation d'immunothérapies revigorant ces lymphocytes T épuisés.

Armstrong et clone 13, différant par quelques mutations et permettant de se placer en contexte d'infection aiguë ou chronique respectivement. En effet, la souche Armstrong conduit à une infection aiguë rapidement résolue (8-10 jours) qui va permettre de générer des lymphocytes T mémoires alors qu'à l'inverse la souche clone 13 induit une infection persistante ne générant pas de LT mémoires. Cette étude princeps démontre que certains LT CD8<sup>+</sup> spécifiques d'un épitope particulier sont éliminés alors que d'autres, reconnaissant un épitope différent, persistent dans une même souris tout en ayant perdu leurs capacités effectrices. Ainsi, bien qu'ils expriment des marqueurs d'activation et soient toujours capables de proliférer *in vivo*, ils perdent leurs fonctions effectrices (cytotoxicité et sécrétion de cytokines). Ces deux types de réponses sont schématisés en [Figure 21](#).

### 4.2.1 Caractéristiques des LT épuisés en contexte infectieux

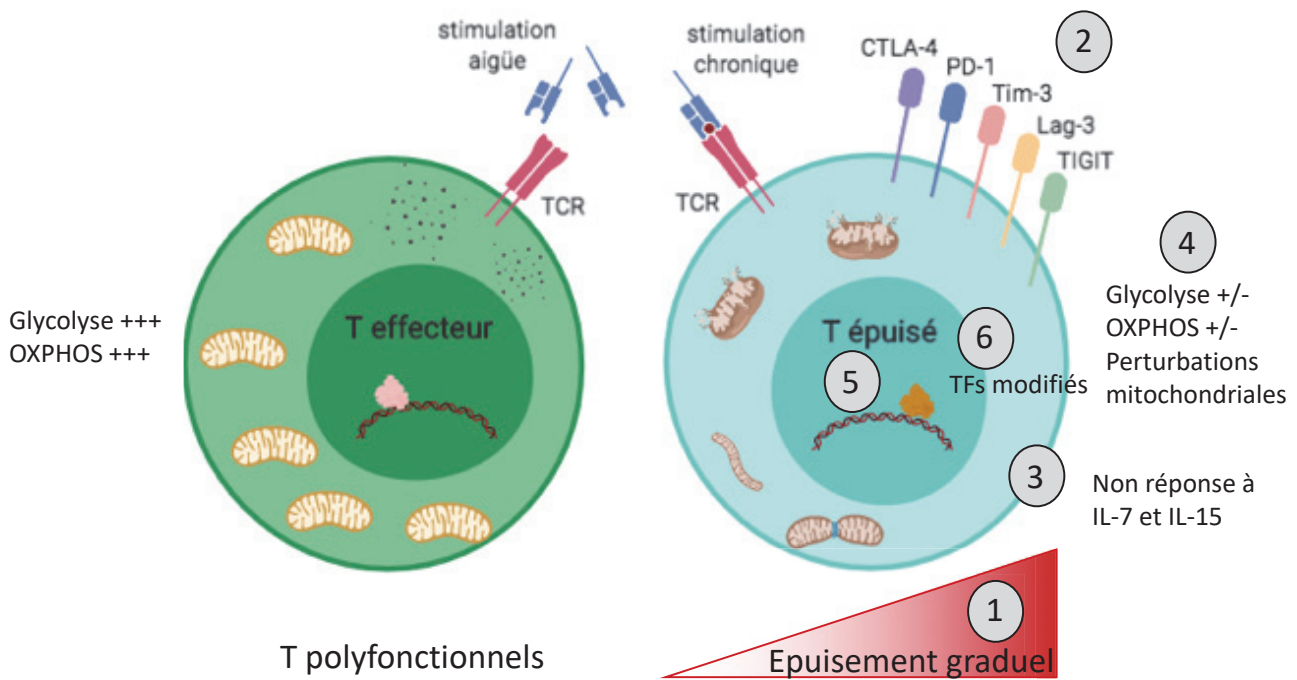
Par la suite, les recherches du groupe de John Wherry ont amplement contribué à établir la définition d'un lymphocyte T épuisé. Ces auteurs définissent le stade épuisé par six caractéristiques (McLane et al., 2019), présentées ci-dessous et schématisées en [Figure 22](#) :

#### 1- Perte progressive des fonctions effectrices

Les lymphocytes épuisés (T<sub>exh</sub>, par opposition aux T<sub>eff</sub> pour effecteurs et T<sub>mem</sub> pour mémoires) perdent leurs fonctions effectrices de manière progressive et hiérarchisée (Wherry et al., 2003) :

- **Stade précoce** : perte de la capacité à produire de l'IL-2 et perte de la capacité à lyser leur cible (cytotoxicité) puis perte de la production de TNF- $\alpha$ .
- **Stade tardif** : perte de la capacité à produire de l'IFN- $\gamma$  et perte de la capacité à dégranuler.





IFN- $\gamma$	+++	+++	++	+/-	-
TNF- $\alpha$	+++	++	+	+/-	-
cytotoxicité	+++	++/-	+	+/-	-
IL-2	+++	+/-	-	-	-
prolifération	+++	++	+	+/-	-

Adapté de Wherry, 2011 et réalisé avec BioRender

### Figure 22: Caractéristiques des lymphocytes T épuisés

Par comparaison avec des lymphocytes T effecteurs mais également mémoires, six caractéristiques des lymphocytes T ont été établies : 1- perte progressive des fonctions effectrices 2- expression maintenue de récepteurs inhibiteurs 3- prolifération homéostatique non soutenue par l'IL-7 et l'IL-15 mais par l'antigène 4- perturbations métaboliques 5- programme transcriptionnel et épigénétique modifié et 6- expression altérée des facteurs de transcription.

TCR : Récepteur des cellules T, TFs : facteurs de transcription, OXPHOS : phosphorylation oxydative

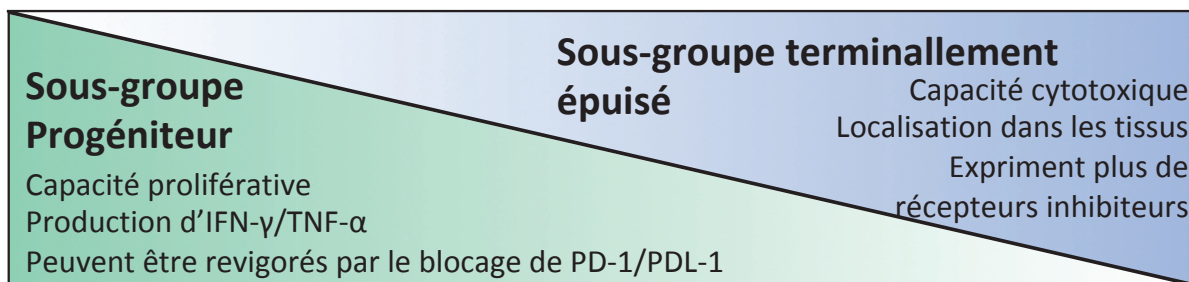
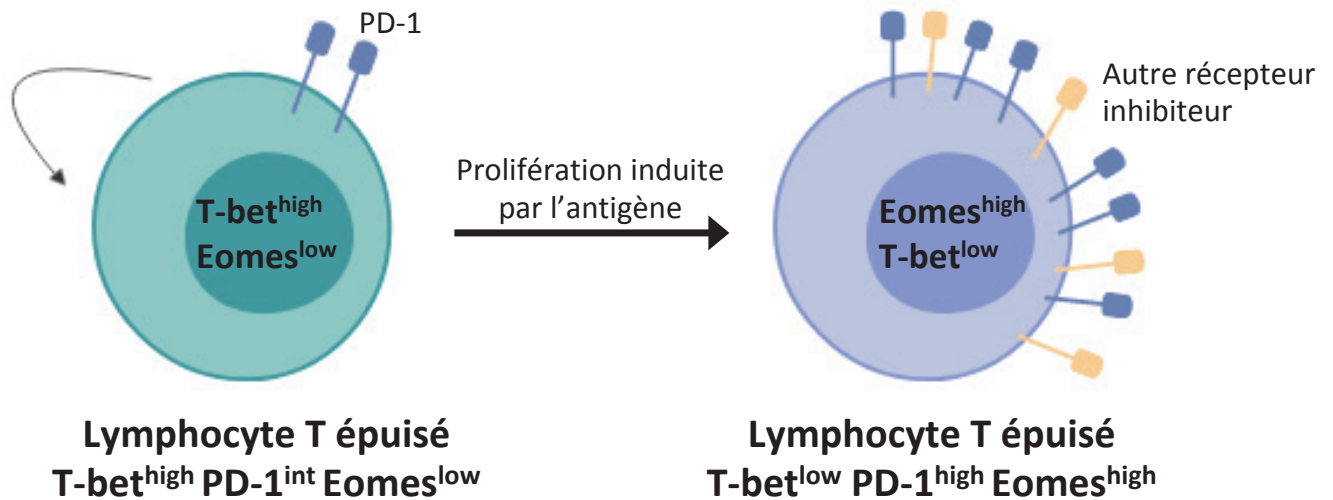
Ces différents stades d'épuisement fonctionnel seraient liés à la charge d'antigène, une charge extrême pouvant même conduire à la délétion des LT CD8<sup>+</sup>.

## 2- Expression forte et maintenue de multiples récepteurs inhibiteurs

Une des caractéristiques des lymphocytes T épuisés est l'expression de récepteurs inhibiteurs de la classe des « immune checkpoints » (ICP) (Blackburn et al., 2009). Ces régulateurs sont des points de rétro-contrôle du système immunitaire qui atténuent normalement la réponse, notamment en cas de stimulation aiguë de l'immunité. Ce mécanisme permet ainsi de limiter les dommages au niveau des tissus et les risques d'immunopathologies qui pourrait survenir en cas de réponse maintenue. Leur expression est ensuite diminuée une fois l'antigène éliminé ; de ce fait, leur expression est induite et maintenue en contexte de stimulation chronique du TCR. Le plus fréquemment exprimé reste PD-1 (« program cell death 1 », récepteur de programme de mort 1, CD229). Par ailleurs, les lymphocytes T épuisés peuvent exprimer ou co-exprimer un large panel d'ICP tels que CTLA-4 (« cytotoxic T lymphocytes associated protein 4 » antigène 4 du LT cytotoxique, CD152), Tim-3 (T cell immunoglobuline and mucin domain containing 3, CD366), Lag-3 (lymphocyte activation gene 3, CD223) et TIGIT (T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domain). Leurs modes d'action seront décrits par la suite.

## 3- Réponse altérée ou faible aux cytokines homéostatiques nécessaires au maintien des T mémoires

Le réservoir de LT mémoires existant chez un hôte est maintenu par la prolifération homéostatique déclenchée par les cytokines IL-7 et IL-15 (Becker et al., 2002; Schluns et al., 2000). En revanche, les LT épuisés ne répondent pas à ces cytokines et leur prolifération est en réalité dépendante de l'antigène. Des expériences de transfert adoptif de LT épuisés provenant de souris infectées par LCMV Clone 13 prouvent que les cytokines IL-7 et IL-15 ne parviennent pas à maintenir ces LT épuisés et que leur auto-renouvellement homéostatique requiert la présence de l'antigène (Shin et al., 2007).



*Adapté de Pauken and Wherry, 2015 et réalisé avec l'aide de BioRender*

### **Figure 23: Hétérogénéité des populations de LT épuisés dans LCMV**

Le premier stade d'épuisement (stade progéniteur) est caractérisé par l'expression forte de T-bet et de PD-1 à un niveau intermédiaire. A ce stade, les cellules possèdent encore la capacité de produire des cytokines et peuvent être revigorées par des thérapies bloquant l'axe PD-1/PDL-1. Dotés de capacité proliférative, les progéniteurs s'auto-renouvellent et donnent également naissance au deuxième stade, le stade terminalement épuisé Eomes<sup>+</sup> où les cellules conservent quelques capacités cytotoxiques mais expriment plus fortement PD-1, ne produisent plus de cytokines et perdent l'expression de T-bet. La prolifération des progéniteurs n'est pas soutenue par l'IL-7 et l'IL-15 contrairement à l'expansion des LT mémoires mais dépend de l'antigène.

Il a été plus récemment montré que deux stades coexistent (Figure 23): le stade progéniteur qui prolifère en réponse à la stimulation antigénique et qui maintient le réservoir de LT épuisés au stade terminal (Paley et al., 2012). Ces deux stades ont été identifiés sur la base de l'expression des facteurs de transcription T-bet et Eomes et de l'ICP PD-1. Le stade progéniteur est caractérisé par la combinaison T-bet<sup>high</sup>, PD-1<sup>int</sup>, Eomes<sup>low</sup>. A l'inverse, le stade terminal se caractérise par la combinaison T-bet<sup>low</sup>, PD-1<sup>high</sup>, Eomes<sup>high</sup>.

#### 4- Altérations métaboliques

Lorsqu'un lymphocyte T naïf, quiescent, rencontre son antigène, son métabolisme est reprogrammé afin de répondre à la demande bioénergétique accrue nécessaire à l'activation. En effet, les lymphocytes T activés prolifèrent et acquièrent leurs fonctions effectrices. L'apport de nutriments est ici essentiel pour permettre ce changement en apportant énergie et intermédiaires de synthèse nécessaires à la création de biomasse. Il est bien établi que les LT basculent ainsi d'un métabolisme catabolique, conservateur, reposant sur la phosphorylation oxydative (OXPHOS) vers un métabolisme anabolique, de synthèse, basé sur la glycolyse aérobie (Buck et al., 2015). Ce processus est dépendant des voies de signalisation en aval du TCR, notamment les voies Akt-PI3K et mTOR. Enfin, les LT mémoires alimentent leurs besoins en énergie par la voie OXPHOS et l'oxydation des acides gras (FAO) (Pearce and Pearce, 2013).

Les LT épuisés présentent eux des défauts au niveau de cette reprogrammation métabolique. La comparaison, par GSEA (gene set enrichment analysis, analyse des groupes de gènes enrichis), des voies métaboliques utilisées par les LT CD8<sup>+</sup> en contexte d'infection aiguë (LCMV, souche Armstrong) et d'infection chronique (LCMV, clone 13) a permis de montrer que la glycolyse est préférentiellement utilisée par les LT effecteurs (infection Armstrong) alors qu'elle est limitée dans les LT épuisés, et ce, rapidement après l'infection par clone 13 (dès la première semaine) (Bensch et al., 2016). Paradoxalement, les gènes participant à l'OXPHOS, ainsi qu'au cycle de Krebs, au métabolisme des acides gras et des acides aminés sont enrichis dans les LT épuisés (infection Clone 13) (Bensch et al., 2016). Le gène

Cpt1a est particulièrement enrichi dans les lymphocytes T peu répondeurs. Ce gène code pour une enzyme essentielle à l'import d'acides gras dans la mitochondrie, acides gras qui alimentent l'OXPPOS. Malgré une activité transcriptionnelle importante de ces voies métaboliques, des expériences de SeaHorse ont montré une plus faible capacité respiratoire des LT épuisés au pic de l'infection (jour 8, mesure du taux de consommation de l'oxygène (OCR, oxygen consumption rate)) (Bengsch et al., 2016). De plus, la surexpression du transporteur de glucose, Glut-1, améliore les fonctions des LT épuisés, suggérant que ces derniers subissent une certaine privation en glucose. La masse mitochondriale mesurée via le marqueur Mitotracker green (MTG) est plus importante en cas d'infection avec clone 13. L'utilisation d'un autre marqueur dépendant du potentiel mitochondrial (Mitotracker Deep Red (MTDR)) souligne la dépolarisation des mitochondries qui survient dans les LT épuisés (à jour 8 du pic d'infection) (Bengsch et al., 2016). Ceci est également associé à des changements morphologiques des mitochondries (élongation des crêtes, fusion des mitochondries) et à une hausse de la production d'espèces réactives à l'oxygène (ROS), délétère pour la cellule. En effet, ces produits causent des dommages au niveau des protéines, de l'ADN ou encore des lipides et peuvent ainsi induire la mort de la cellule par apoptose ou nécrose (Redza-Dutordoir and Averill-Bates, 2016). De plus, chez l'homme, ce type de dérégulations métaboliques survenant dans les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> épuisés a été retrouvé au cours de l'infection par le VHB avec notamment la dépolarisation des mitochondries et une perte de la capacité à utiliser l'OXPPOS (Schurich et al., 2016). Les défauts métaboliques apparaissent donc très précocement et touchent différentes voies.

## 5- Programmes transcriptionnels et épigénétiques différents de ceux des LT effecteurs et des LT mémoires

L'établissement du profil transcriptionnel des LT épuisés comparé à celui des LT mémoires et effecteurs dans le modèle LCMV a mis en évidence des changements majeurs dans l'expression des récepteurs inhibiteurs et des récepteurs co-stimulateurs, des facteurs de transcription, des molécules impliquées dans la signalisation en aval du TCR, des récepteurs aux chimiokines et cytokines et autres

molécules impliquées dans la migration et l'adhésion, et dans les gènes du métabolisme (Wherry et al., 2007). Cette dernière étude a notamment identifié 338 gènes exprimés de manière différentielle dans les LT CD8<sup>+</sup> épuisés comparés aux LT effecteurs et mémoires. De plus, ce programme transcriptionnel est différent de celui établi lors du processus d'anergie. Plusieurs signatures ont été déterminées et comparées dans différentes maladies (Bengsch et al., 2018) et les gènes majeurs impliqués dans l'épuisement seraient liés à de nombreuses voies incluant la voie de réparation des dommages de l'ADN, la voie Wnt et Bcl2 ou encore à la biologie de la chromatine. On retrouve évidemment Pdcd1 (codant pour PD-1) et aussi Cpt1a comme mentionné précédemment (Bengsch et al., 2016; Doering et al., 2012; Wherry et al., 2007) mais également d'autres gènes codant pour des facteurs de transcription ou encore Rtp4 (receptor transporting protein 4 permettant d'exprimer à la surface certains récepteurs couplés aux protéines G).

Enfin, ce changement de profil transcriptionnel est corrélé à de profondes modifications épigénétiques, elles aussi spécifiques de l'état épuisé. Celles-ci ont notamment été définies par utilisation de la technique ATAC-Seq (assay transposase accessible chromatin with high-throughput sequencing, séquençage à haut débit des régions accessibles de la chromatine par utilisation de transposase) dans le modèle LCMV chez la souris et chez l'homme au cours de l'infection par le VIH (Sen et al., 2016). Il est intéressant de souligner que cette étude montre que les changements épigénétiques observés dans le modèle murin sont similaires à ceux de quatre donneurs humains infectés par le VIH. Globalement, les régions accessibles de la chromatine diffèrent de manière prononcée entre les lymphocytes effecteurs, mémoires et épuisés. L'accessibilité de la chromatine est moindre au niveau des sites d'initiation de la transcription mais au contraire augmentée au niveau des régions inter-géniques, introniques et distantes des promoteurs ce qui correspond préférentiellement aux régions de fixation des éléments de régulation de type activateurs (« enhancers »). La plasticité de cet état n'est pas clairement définie mais ces changements pourraient être réversibles et donc ciblés dans de nouvelles thérapies.

## 6- Expression modifiée et altérée de facteurs de transcription par rapport au LT effecteurs et aux LT mémoires

L'identification des modules transcriptionnels propres à la condition d'épuisement révèle l'absence du module de quiescence associé aux lymphocytes T mémoires et suggèrent que les mêmes facteurs de transcription peuvent être utilisés mais de manière différente (connexion avec d'autres gènes ou circuits transcriptionnels) pour conduire à des programmes développementaux distincts (Doering et al., 2012). Différentes études ont permis de définir un ensemble de facteurs de transcription engagés dans le processus d'épuisement incluant Foxp1, Ikzf2, Zeb2, Lass6, Tox, Tcf-1, IRF4, NFAT, T-bet et Eomes (Doering et al., 2012; Man et al., 2017; Martinez et al., 2015; Paley et al., 2012). Le facteur de transcription NR4A1 (Nur77) joue également un rôle et semble orchestrer un programme de tolérance (Liu et al., 2019). Les lymphocytes T déficients pour NR4A1 sont moins épuisés et expriment moins de PD-1 et Tim-3 que les cellules sauvages de souris infectées par la souche clone 13. Récemment, une analyse par single cell RNA Seq, a permis de montrer que les cellules T épuisées au cours de l'infection par LMCV divergent des cellules mémoires par un module d'enrichissement de gènes incluant le facteur de transcription Tox (thymocyte selection-associated high mobility group box protein) (Yao et al., 2019). En effet, Tox apparaît comme un régulateur clé pour la différenciation en T épuisés en induisant l'expression de PD-1 et pour leur maintien au cours de l'infection chronique (Khan et al., 2019). L'expression réduite de PD-1 ainsi que l'amélioration conjointe des fonctions effectrices des lymphocytes T a été mise en évidence dans les souris infectées chroniquement par LCMV mais déficientes pour Tox (Alfei et al., 2019). De plus, dans l'infection chronique par le VHC chez l'homme, les lymphocytes T présentent également une expression augmentée de ce facteur (Alfei et al., 2019).



## 4.2.2 Caractéristiques des lymphocytes T épuisés en contexte tumoral

Par analogie avec les infections chroniques, la perte de fonction des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> survient également au cours de la progression tumorale. Ceci a été démontré tant dans des modèles murins que chez l'homme (Thommen and Schumacher, 2018). La plupart des caractéristiques de l'épuisement sont communes aux deux situations de stimulation chronique.

Tout d'abord, les lymphocytes T infiltrant les tumeurs (TILs) expriment également de manière forte et maintenue des ICP tels que PD-1, CTLA-4, Lag-3, Tim-3 et TIGIT (Anderson et al., 2016; Baitsch et al., 2011; Fourcade et al., 2010). Ils présentent les mêmes défauts fonctionnels que dans le contexte d'infection chronique, plus précisément la perte des capacités cytotoxiques et de la production de cytokines.

De manière similaire aux infections chroniques, la perte de fonction des LT en contexte tumoral est un processus graduel. L'existence des deux sous types précédemment décrits, progéniteurs et terminal, a en effet été montrée. Trois stades ont tout d'abord été définis basés sur l'expression de Tim-3 et de PD-1 : double négatif (DN), simple positif (SP) et double positif (DP) ; ces dernières présentant les fonctions effectrices les plus altérées (Sakuishi et al., 2010).

Ces données ont maintenant été précisées : les cellules progénitrices expriment CXCR5 et de manière intermédiaire PD-1 ; elles conservent leur poly-fonctionnalité et peuvent persister à long terme alors que les cellules terminalement épuisées expriment fortement PD-1 ainsi que d'autre ICP (notamment Tim-3) (Miller et al., 2019). SLAMF6 semble également être un marqueur discriminant les deux stades. En effet, les progéniteurs (SLAMF6<sup>+</sup> Tim-3<sup>-</sup>) sont responsables de la réponse à la thérapie anti PD-1 et leur présence est donc associées à une meilleure survie chez les patients (Miller et al., 2019).

L'analyse en single cell RNA Seq des trois stades (DN, SP, DP décrits plus haut) de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> infiltrant la tumeur (modèle murin CT26 de carcinome du colon) a permis de mettre en évidence une signature transcriptionnelle spécifique aux LT épuisés (Singer et al., 2016), et certains clusters identifiés sont également retrouvés dans l'infection chronique par LCMV (étude de Doering et al., 2012. En utilisant deux



scores : activation et dysfonction, Singer *et al.* définissent quatre modules distincts : naïf, activé, activés/dysfonctionnel et dysfonctionnel présentant chacun une signature transcriptionnelle propre. Le module dysfonctionnel est caractérisé par la régulation positive de nombreux gènes incluant notamment MT1 (une métallothionéine impliquée dans le métabolisme du Zinc), Serpin 2, GzmC, Tox et T-Bet.

De manière intéressante, la surexpression de Tox dans des lymphocytes T cultivés *in vitro* conduit à la mise en place d'un programme épigénétique associé à l'épuisement. A l'inverse, les lymphocytes T déficients pour Tox dans des souris présentant des tumeurs, ne régulent pas positivement l'expression des ICP mais demeurent malgré tout dysfonctionnels (Scott et al., 2019). Ces résultats suggèrent donc que l'épuisement n'est pas simplement dépendant des voies de régulations négatives induites par les ICP et que Tox semble suffisant mais pas nécessaire à l'induction de l'épuisement.

Des différences concernant les dérégulations des facteurs de transcription sont observées en comparaison avec le modèle LCMV. Par exemple, l'expression d'Eomes est plutôt diminuée au cours de l'épuisement en contexte tumoral (Schietinger et al., 2016).

Un autre facteur de transcription, GATA-3 fut identifié comme un facteur clé conduisant à l'épuisement T dans le modèle CT26 (Singer et al., 2016). Chez l'homme, des signatures associées à l'épuisement ont également été rapportées comme c'est le cas pour le mélanome (Tirosh et al., 2016). On retrouve ici des gènes codant pour les ICP comme Tim-3, PD-1 ou TIGIT qui peuvent être co-exprimés et des combinaisons de gènes associées au phénotype épuisé.

Ces profils transcriptionnels sont aussi associés à des changements épigénétiques qui surviennent rapidement au cours de la tumorigénèse (Philip et al., 2017) et définissent deux états : réversibles et fixés. La plupart des modifications touchent les régions introniques ou inter-géniques comme c'est le cas pour LCMV. Des défauts métaboliques caractérisent également les LT infiltrant la tumeur (TILs) dysfonctionnels tels qu'une diminution de la masse mitochondriale, une dépolarisation des mitochondries et une baisse de leurs capacités respiratoires. La prise de glucose mesurée par la sonde fluorescente analogue du glucose 2NBDG est également diminuée dans les TILs (Scharping et al., 2016). La compétition pour

le glucose entre les cellules tumorales et les TILS a par ailleurs été démontrée (Chang et al., 2015). Malgré de nombreuses similarités concernant les caractéristiques des lymphocytes T dysfonctionnels dans les deux situations (infection chronique et cancer), celles-ci apparaissent tout de même comme contexte dépendant. En effet, les signaux conduisant à la perte de fonction des cellules sont différents et spécifiques de l'environnement, ce que nous allons maintenant détailler.

### 4.2.3 Causes et mécanismes moteurs de l'épuisement

Les mécanismes conduisant à cet état d'hypo-réactivité sont nombreux et leurs interactions sont complexes. Ils peuvent être intrinsèques ou extrinsèques aux cellules. Ils sont liés à l'environnement et vont donc différer entre les contextes d'infection chronique et de cancer.

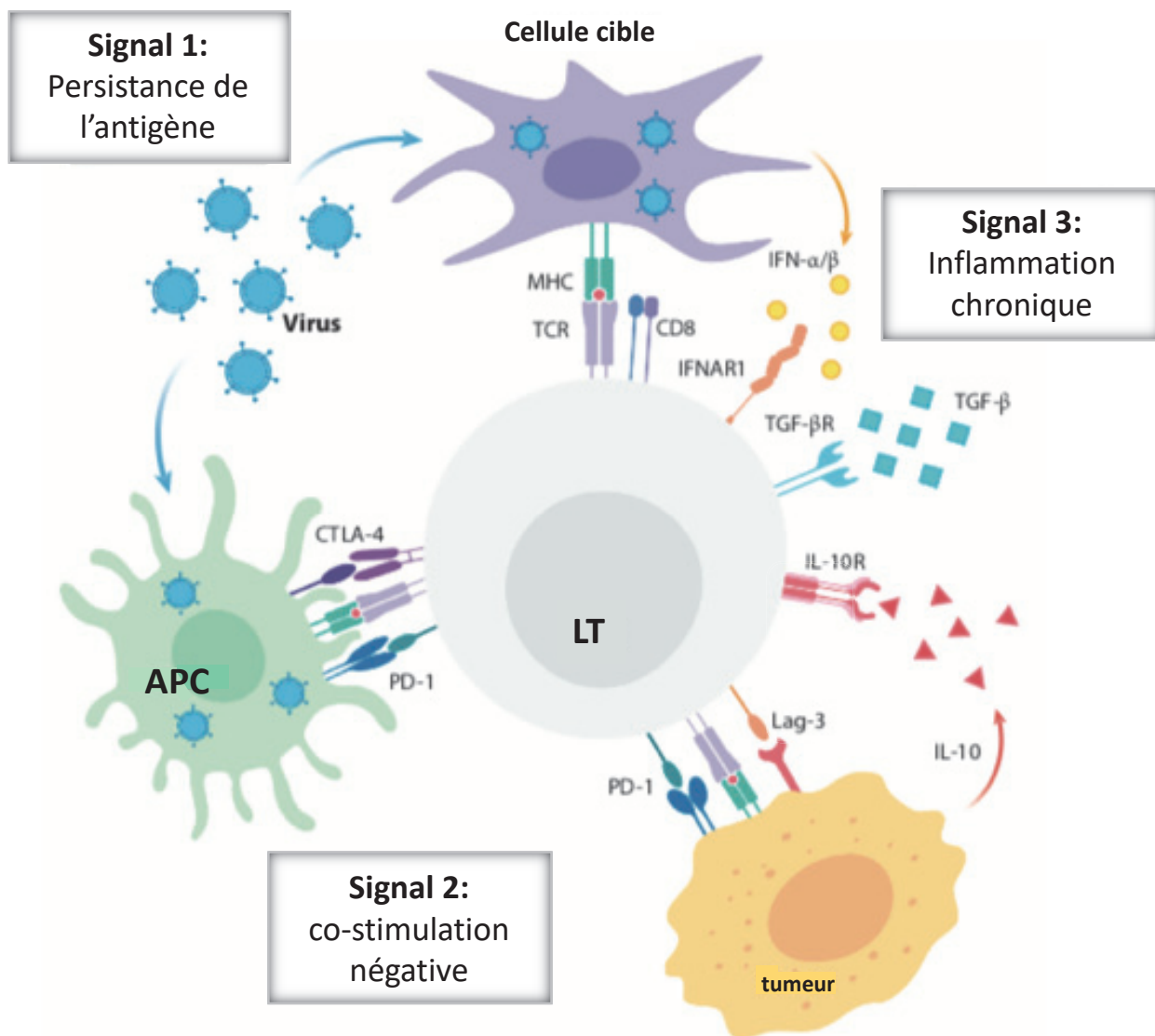
Un modèle regroupant trois signaux clés pour le processus d'épuisement a été décrit (revue de McLane et al., 2019) et est résumé en **Figure 24**:

- Signal 1 : persistance de l'antigène et stimulation du TCR
- Signal 2 : signal de co-stimulation négative (ICP)
- Signal 3 : cytokines et inflammation chronique

Le terme d'épuisement suggère la présence d'un signal fort, stimulateur et persistant dans le temps ce qui finit par « épuiser » la cellule effectrice. En ce sens, le signal 1 est le seul qui semble nécessaire. Les deux autres sont des conséquences du premier et peuvent être présents sans entraîner de l'épuisement.

#### - Exposition chronique aux antigènes

Le principal moteur de l'épuisement est la persistance de l'antigène au cours du temps et donc une stimulation du TCR maintenue dans le temps (Bucks et al., 2009; Shin et al., 2007). Sans stimulation chronique, il n'y a pas d'épuisement. Une autre composante est la charge virale élevée alors que de plus faible taux d'antigène favorisent plutôt la formation de LT effecteurs (Mueller and Ahmed, 2009; Utzschneider et al., 2016).



Modifié à partir de McLane et al., 2019

### Figure 24: Modèle à 3 signaux de l'épuisement T

Le premier signal est la persistance chronique de l'antigène (virus ou tumeur) qui va éventuellement conduire à l'expression maintenue de récepteurs inhibiteurs de type ICP notamment, tels que CTLA-4 ou PD-1 à la surface des lymphocytes T. Ces récepteurs engagés par leurs ligands à la surface des cellules tumorales ou des cellules myéloïdes comme les cellules présentatrices d'antigènes (APC) fournissent ainsi le deuxième signal de co-stimulation négative qui empêche le bon fonctionnement des lymphocytes T. De plus, l'inflammation chronique due à la persistance de l'antigène et générée par les cellules infectées ou tumorales, les APC ou encore les cellules immunosuppressives constituent le troisième signal via principalement les cytokines produites. Ces cytokines peuvent être de type pro-inflammatoires (IFN de type I par exemple) ou anti-inflammatoires (IL-10 et TGF- $\beta$ ).

Par conséquent, l'épuisement peut être empêché lorsque le signal de stimulation chronique est supprimé. En effet, des expériences de transfert adoptif montrent que si les lymphocytes T épuisés sont transférés dans une souris naïve au cours de la première semaine suivant l'infection, ils acquièrent des fonctions effectrices lors d'une réinfection aigüe (Brooks et al., 2006a). La persistance de l'antigène entraîne également des modifications sur d'autres cellules immunitaires (cellules présentatrices d'antigène, cellules immunorégulatrices) qui participent à la régulation des réponses T et qui vont donc affecter également leurs fonctions.

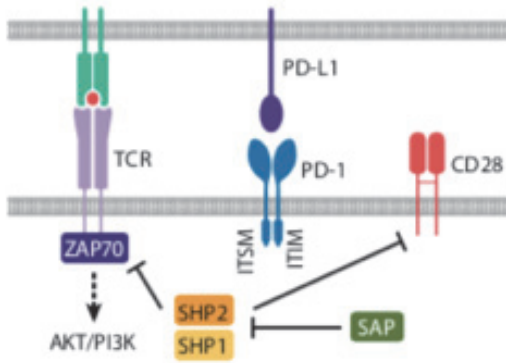
- Expression maintenue d'ICP :

Comme nous l'avons vu, les ICP sont induits par la stimulation chronique du TCR en tant que rétro-contrôle. En ce sens, ils sont donc une conséquence de l'épuisement plus qu'une cause mais amplifie le phénomène. Ces récepteurs inhibiteurs vont avoir un rôle direct par inhibition des voies d'activation et indirect en favorisant les cellules immuno-régulatrices (Anderson et al., 2016). L'expression de leurs ligands est notamment augmentée à la surface des cellules tumorales (Anderson et al., 2016; Keir et al., 2006) ce qui leur permet par le biais de mécanismes physiologiques d'inhiber les LT. Sans la présence du ligand, un ICP est inerte et la cellule qui l'exprime n'est pas épuisée. Les quatre principaux, pouvant être co-exprimés vont maintenant être détaillés et leur signalisation est présentée en **Figure 25**. Cependant, il est important de noter que d'autres co-récepteurs tels que OX40, CTLA-4, 41BB et CD27 peuvent être aussi impliqués dans le processus d'épuisement (McLane et al., 2019).

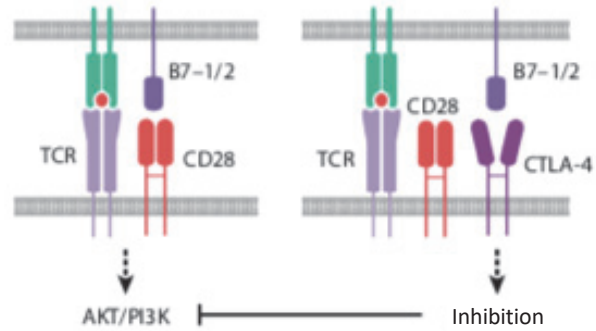
• **PD-1 :**

Comme nous l'avons vu PD-1 a été majoritairement retrouvé comme exprimé à la surface des lymphocytes T épuisés. Ses ligands PDL-1 (B7H1) et PDL-2 (B7-DC) sont exprimés à la surface des cellules immunitaires (DC, macrophages, LB) et des cellules tumorales. Comme décrit plus haut pour l'inhibition des cellules NK, la voie dépendante d'ITIM est induite une fois le récepteur engagé. On assiste donc à la phosphorylation des tyrosines présentes dans le domaine ITIM intra-cytoplasmique et au recrutement de SHP-2 qui va bloquer les voies d'activation en aval du TCR :

### a. Signalisation ITAM/ITIM



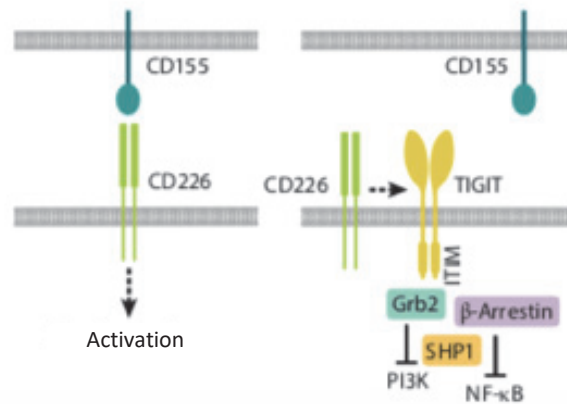
### b. Compétition entre récepteurs



### c. Signalisation non conventionnelle



### d. Inhibition mixte



Modifié à partir de McLane et al., 2019

## Figure 25: Signalisation des ICP

La signalisation qui fait suite à l'engagement de PD-1 passe par les motifs ITIM et permet le recrutement de SHP-2 pour bloquer ensuite les voies d'activation en aval du TCR (a). L'inhibition peut également se faire par compétition pour un même ligand comme c'est le cas du corécepteur inhibiteur CTLA-4 qui possède le même ligand que CD28, un corécepteur activateur (b). D'autres types de signalisations non conventionnelles existent, mettant en jeu des motifs KIELLE comme pour Lag-3 inhibant les voies permettant la prolifération des cellules ou encore Tim-3 qui va être phosphorylé en intra-cytoplasmique libérant ainsi la protéine BAT-3 et permettant de recruter SHP-2. Enfin, des modes d'inhibitions mixtes peuvent être utilisés. C'est le cas de TIGIT qui va à la fois rentrer en compétition avec DNAM-1 (CD226) pour leur ligand CD155 mais aussi inhiber la cellule via son motif ITIM en intra-cytoplasmique.

PI3K-Akt, mTOR et MAP Kinases sans que les cibles directes de SHP-2 soient connues. En effet, l'activation de PD-1 *in vitro* conduit à l'atténuation de ces voies, et diminue la glycolyse et l'OXPPOS dans les lymphocytes T (Patsoukis et al., 2015). Cependant, de manière contre-intuitive, ce sont les lymphocytes T épuisés les plus différenciés (PD-1<sup>high</sup>) dans le modèle LCMV qui présentent la plus forte activité de mTOR au niveau basal (Bengsch et al., 2016). Après restimulation, les cellules épuisées sont ici incapables d'induire pS6 et donc d'activer la voie mTOR. Cette activation persistante de mTOR au-delà du jour 8 post-infection, probablement causée par la sur-stimulation du TCR, est à l'origine de l'apparition de mitochondries dépolarisées. Ce lien est confirmé par un traitement pharmacologique avec de la Rapamycine, un inhibiteur de mTOR, aux stades précoces de l'infection par le clone 13. Ces dommages sont maintenus dans le temps au cours de l'infection chronique (jusqu'au jour 30). Par ailleurs, le blocage précoce de PD-1 conduit à une prise de glucose accrue, à une réduction de la masse mitochondriale et à une repolarisation mitochondriale, ce qui démontre que PD-1 est à la base de ces altérations métaboliques. Il semble que le défaut mitochondrial soit lié à la suppression par PD-1 du régulateur métabolique PGC1- $\alpha$  (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1), impliqué dans la biogenèse mitochondriale (Bengsch et al., 2016).

Une autre étude démontre également que les altérations métaboliques au niveau des TILs sont associées à l'expression d'ICP et à la suppression de PGC1- $\alpha$  par la voie Akt. Le blocage par PD-1 est bénéfique et améliore les capacités métaboliques mais n'est pas suffisant pour les restaurer complètement (Scharping et al., 2016). Enfin, les thérapies anti-PDL-1 permettent de bloquer non seulement le signal négatif passant par PD-1 à la surface des TILS mais inhibent également la glycolyse dépendante de l'activation de mTOR par PDL-1, dans les cellules tumorales (Chang et al., 2015). Par ce deuxième mécanisme, le blocage de PDL-1 empêche la privation en glucose et augmente ainsi la quantité de glucose disponible dans l'environnement pour les LT.

- **TIGIT :**

TIGIT, ainsi que CD96 (TACTILE) qui fixe les mêmes ligands, sont des récepteurs inhibiteurs (Chan et al., 2014). Leur pendant activateur à la surface des cellules

lymphocytaires est DNAM-1 (CD226) (Bottino et al., 2003b) . TIGIT possède une meilleure affinité pour leurs ligands communs CD155 et CD112, exprimés par les cellules tumorales et agit donc par compétition. L'engagement de TIGIT conduit à la phosphorylation des motifs intra-cytoplasmiques ITIM et ITT via les kinases Fyn et Lck qui recrutent alors la phosphatase SHP-1 et bloquent les voies PI3K, MAP Kinases et NFκB ainsi que de nombreuses molécules en aval de la signalisation du TCR (Levin et al., 2011). De plus, TIGIT peut également directement lier DNAM-1 provoquant des altérations dans l'homo-dimérisation de celui-ci et contrant ainsi ses fonctions (Anderson et al., 2016). Enfin, TIGIT peut interagir avec son ligand CD155 exprimé à la surface des DC. Les voies de signalisation qui en découlent, conduisent à la diminution de la production d'IL-12 mais à l'augmentation de la sécrétion d'IL-10 par les DC (Yu et al., 2009).

- **Lag-3 :**

Lag-3 ne possède pas de motif ITIM dans sa partie intra-cytoplasmique mais un motif KIEELE (Workman and Vignali, 2003). Son principal ligand est le CMH de classe II mais certaines données suggèrent l'existence d'un autre ligand, LSECTin pouvant interagir avec les lymphocytes T et les cellules NK (Xu et al., 2014). Son expression à la surface des lymphocytes T est notamment corrélée avec la sévérité de l'infection.

- **Tim-3 :**

Tim-3, codé par le gène *Havcr2*, peut interagir avec différents ligands tels que Galectine 9, HMGB1 et Ceacam-1 (Anderson et al., 2016). Deux résidus tyrosine présents dans sa queue cytoplasmique peuvent être phosphorylés par les kinases Src et ITK, ce qui libère la protéine Bat-3 et permet le recrutement de SHP-2 pour ensuite réguler la signalisation sous le TCR (Lee et al., 2011; Rangachari et al., 2012). Son expression est notamment régulée par le facteur de transcription T-bet (Anderson et al., 2010). Cependant, une étude de 2018 utilisant le modèle LCMV, suggère que Tim-3 est plutôt un marqueur d'activation. Les lymphocytes T exprimant Tim-3 présentent une expression accrue de Nur77, un facteur de transcription induit par l'activation sous le TCR (Avery et al., 2018). De plus, une déficience en Tim-3 ne modifie pas le phénotype d'épuisement. Tim-3 est à l'inverse requis pour des



fonctions optimales mais pourrait tout de même participer au processus d'épuisement en empêchant le maintien à long terme des cellules T et la génération de lymphocytes mémoires (Avery et al., 2018).

En conclusion, l'idée que les ICP sont en fait protecteurs des fonctions effectrices émerge et est renforcée par d'autres études montrant que les ICP sont des corrélats de l'épuisement induits par l'activation mais non pas des causes. En effet, des travaux utilisant des souris déficientes pour PD-1 montrent que l'épuisement induit par LMCV survient même en l'absence de cet ICP et que les LT déficients pour PD-1 sont plus épuisés que les LT sauvages (Odorizzi et al., 2015). Ceci rejoint les données révélant que les souris déficientes pour Tim-3 présentent une réponse effectrice diminuée comparée à leurs homologues sauvages (Avery et al., 2018).

- Exposition chronique aux cytokines pro inflammatoires :

Les quantités de cytokines pro-inflammatoires produits principalement par les cellules myéloïdes au cours d'une infection ou de la progression tumorale vont rester élevées et jouent également un rôle dans l'épuisement. C'est le cas par exemple des IFN de type I ( $\alpha/\beta$ ) sécrétés majoritairement par les pDC, qui participent au contrôle en supprimant directement la réplication virale mais qui en contexte chronique vont avoir un rôle plus complexe. En effet, ces médiateurs de l'inflammation vont induire plusieurs régulateurs des réponses T tels que la cytokine anti-inflammatoire IL-10 ou des ligands des ICP notamment PDL-1 à la surface des cellules myéloïdes. L'enzyme de catabolisme du tryptophane IDO (indoleamine 2,3- dioxygénase) peut également être induite. Cette enzyme déplete l'environnement en tryptophane (acide aminé essentiel) et empêche ainsi le bon fonctionnement des cellules. Cela conduit à l'accumulation de Kynurenine qui favorise les lymphocytes T régulateurs (LT reg) (Puccetti and Grohmann, 2007).

Enfin, d'autres cytokines, comme par exemple, IL-6, TNF, IL27, IL-35, CXCL9/10 et CXCL13 vont également favoriser la tolérance des lymphocytes T (McLane et al., 2019).



#### - Cytokines immunosuppressives :

Les taux de certaines cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 et le TGF $\beta$  qui peuvent promouvoir l'épuisement sont fortement augmentés en contexte tumoral ou d'infections persistantes. Le TGF- $\beta$ 1 est considéré comme une des cytokines les plus immunosuppressives et peut freiner l'activation des lymphocytes et promouvoir la tolérance (revue de Li et al., 2006). Il est produit sous une forme inactive qui va ensuite être activée par clivage protéolytique via des métalloprotéinases. Sous cette forme, il peut fixer ses récepteurs TGF- $\beta$  RI/RII ce qui transduit un signal reposant notamment sur les protéines SMAD. Ses effets sont multiples. On peut ainsi noter sa capacité à promouvoir le développement des LT régulateurs (Huber et al., 2004), le blocage dans les cellules cibles d'une multitude de voies de signalisation impliquées dans l'activation et la migration et la diminution de l'expression de T-bet (Kehrl et al., 1986; Ranges et al., 1987). L'IL-10 est une autre cytokine anti-inflammatoire qui joue également un rôle dans la tolérance et peut inhiber les fonctions des lymphocytes T (Brooks et al., 2006b).

#### - Médiateurs solubles :

D'autres médiateurs solubles sont également impliqués dans ce processus. Chen *et al.*, ont notamment mis en évidence le rôle de la prostaglandine (PGE<sub>2</sub>) dans la suppression des fonctions effectrices des lymphocytes T. De plus, les lymphocytes T de souris infectées par LMCV clone 13 présentent une augmentation de l'expression des récepteurs à la prostaglandine (EP2/EP4) (Chen et al., 2015).

Une autre molécule ayant un rôle dans l'épuisement provient de la conversion de l'ATP en ADP puis en adénosine (Kobie et al., 2006). Dans le milieu extracellulaire, ces réactions de conversion sont respectivement catalysées par les enzymes CD39 et CD73 exprimées notamment à la surface des T reg. De plus leur expression est également augmentée à la surface des cellules tumorales. Enfin, l'ecto-enzyme CD39 est qualifiée de marqueur des cellules T épuisés en contexte viral notamment (Gupta et al., 2015). L'adénosine va ensuite assurer des fonctions immunosuppressives par liaison à ses récepteurs (A<sub>2</sub>AR) à la surface des LT (Borsellino et al., 2007; Kobie et al., 2006).

- Facteurs métaboliques :

La tumeur en elle-même va également contribuer indirectement à la perte des fonctions effectrices en agissant par compétition pour les sources d'énergie disponibles et en produisant différents métabolites au sein du microenvironnement tumoral (TME) (revue de Thommen and Schumacher, 2018). En effet, la prolifération tumorale requiert beaucoup d'énergie et pour répondre à cette forte demande, les cellules tumorales augmentent les voies de la glycolyse et de l'OXPPOS. Ceci conduit à la production de métabolites suppressifs tels que l'acide lactique ou les ROS et à la diminution de la quantité de nutriments disponibles pour les autres cellules du TME notamment les cellules immunitaires. On observe donc dans le TME des taux de glucose, d'acides gras et d'acides aminés disponibles, comme la glutamine, plus faibles, une diminution de la disponibilité en oxygène (hypoxie), et un pH plus bas. Tous ces facteurs vont contribuer à déréguler les fonctions immunitaires (Thommen and Schumacher, 2018). Les cellules tumorales sécrètent également des enzymes comme IDO ou encore l'Arginase qui dégrade l'arginine, un acide aminé essentiel au bon fonctionnement des lymphocytes T (Munder et al., 2009).

- Cellules immuno-régulatrices :

Comme nous l'avons vu de nombreux facteurs contribuent à recruter des cellules immunosuppressives notamment les T reg qui participent à l'inhibition des fonctions lymphocytaires. Un autre type de cellules régulant négativement les lymphocytes T correspond aux cellules suppressives dérivées des myéloïdes (MDSC), des cellules similaires aux neutrophiles mais différant en terme de fonctionnalité car elles ont un rôle immuno-suppressif via la production notamment de ROS, d'INOS (oxide nitric synthase) et d'arginase (Goh et al., 2013).

Enfin, les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> sont régulés par d'autres types de cellules immunitaires telles que les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, les cellules présentatrices d'antigène et les cellules NK. La suppression des LTCD4<sup>+</sup> conduit d'ailleurs à un épuisement des LTCD8<sup>+</sup> plus sévère, suggérant que les LTCD4<sup>+</sup> participent à contrer ce processus (Zajac et al., 1998). Un rôle des cellules NK dans le maintien de l'épuisement des LTCD8<sup>+</sup> via l'élimination des LTCD4<sup>+</sup> a été mis en évidence dans le

modèle LMCV persistant en présence de fortes doses de virus (Waggoner et al., 2011).

- Contribution des facteurs de transcription :

Comme nous l'avons vu, des modifications au niveau de l'expression de facteurs de transcription (T-bet, Eomes, Tcf-1, NFAT, Foxo1, Blimp-1, BATF, IRF4, NR4A1 (Nur77), Tox) surviennent dans les LT épuisés et contribuent à l'épuisement en activant ou réprimant différentes voies (McLane et al., 2019). A cela s'ajoute les changements de structure de la chromatine perturbant le programme épigénétique. Bien qu'aucun facteur clé n'ait été clairement identifié, l'ensemble de ces perturbations peuvent être impliquées dans le processus d'épuisement.

## 4.3 Perte de fonctionnalité des cellules NK

### 4.3.1 Observations descriptives de la perte de fonctionnalité des cellules NK

De manière similaire au processus d'épuisement des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, un état de tolérance des cellules NK a été mis en évidence en contexte de stimulation chronique ou de sur-stimulation limitant ainsi leur potentiel anti-tumoral et anti-infectieux (Bi and Tian, 2017).

L'altération des fonctions effectrices NK est observée dans de nombreux types de cancers tant dans des modèles murins (Ardolino et al., 2014; Ohs et al., 2017; Seo et al., 2017a; Zhang et al., 2018b) que chez l'homme, comme le cancer du sein (Mamessier et al., 2011), le cancer du côlon et du pancréas (Peng et al., 2013; Rocca et al., 2013), le cancer du foie (Sun et al., 2015, 2017; Zhang et al., 2017), le mélanome (da Silva et al., 2014), et le poumon (Platonova et al., 2011), mais aussi dans les cas de cancers hématologiques, telles que le myélome (Guillerey et al., 2015) ou les leucémies aiguës myéloblastiques (AML) (Coles et al., 2011). De plus, les cellules NK présentent également des fonctions altérées dans le cas d'infections chroniques telles que les infections par le VHB (Sun et al., 2012), le VHC (Varchetta et al., 2012) et le VIH (Lichtfuss et al., 2012).

Le **Tableau 3** résume les principales études ayant démontré la perte de fonction des cellules NK dans des modèles tumoraux murins.

Bibliographie	Modèle utilisé	Fonctions effectrices	Mécanismes
Ardolino JCI 2014, JCI 2018	RMA-S (MHC-I low) SC	Faible	PD-1, baisse de pERK
Seo Nat Comm 2017	TC1 H2 K/D KO SC	Faible	Tim-3 PD-1, baisse de pERK
Ohs Cancer Research 2017	4T1 mammary tumor SC	Faible	TIGIT, PD-1 after IL-12
Zhang Nat Immunol 2018	<b>B16 et 4T1 IV</b> et SC, CT26 SC sarcome induit par le MCA	Faible	TIGIT (+CD96)
Gao Nat Immunol 2017	Sarcome induit par le MCA <b>B16 IV, RM-1 IV</b>	Faible	ICP (Lag3, CTLA-4, CD96), conversion en ILC-1 par le TGF-β
Gill Blood 2012	A20 SC	Faible	Baisse de T-bet et Eomes, pas de PD-1
Cong Cell Metabolism 2018	Cancer poumon induit par KRAS	Faible	Augmentation de FBP-1, ROS et TGF-β, pas d'ICP
André Cell 2018	A20 SC	Faible	NKG2A

**Tableau 3: Principales études concernant la perte de fonctionnalité des cellules NK chez la souris**

SC : sous-cutané, IV : intraveineux. Les modèles induisant des métastases dans d'autres organes sont indiqués en rouge dans le tableau.

### 4.3.2 Caractéristiques des cellules NK non fonctionnelles

#### 1- Perte des fonctions effectrices :

La dysfonction des cellules NK se caractérise par une diminution de leur capacité à sécréter des cytokines, à dégranuler, à tuer leurs cibles et par la diminution des molécules cytotoxiques telles que granzyme B et perforine. Ainsi, dans un modèle murin utilisant le mélanome B16, les cellules NK infiltrant la tumeur perdent leur capacité à sécréter les cytokines IFN- $\gamma$  et GM-CSF (Paul et al., 2016). C'est le cas également chez l'homme dans le cancer du sein, où les auteurs observent également une diminution de la production de TNF- $\alpha$ , de la dégranulation (expression de CD107a) et de la capacité à tuer des cibles après re-stimulation *ex vivo* (Mamessier et al., 2011). D'autres défauts tels que la diminution des quantités de perforine et GzmB ont été mis en évidence dans le cancer du pancréas et du côlon (Peng et al., 2013) mais également dans le cancer du foie (Sun et al., 2017). Chez les patients chroniquement infectés par le VHB, les cellules NK perdent également leur potentiel cytotoxique et leur capacité à produire des cytokines (Peppas et al., 2010; Sun et al., 2012).

Un sous type particulier de cellules NK CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup> ayant également des fonctions fortement impactées a été identifié chez les patients infectés par le VIH (Mavilio et al., 2005).

La perte des fonctions effectrices a été observée à la fois pour les cellules NK infiltrant la tumeur ou au site d'infection et pour les cellules NK du sang périphérique (Mamessier et al., 2011; Peppas et al., 2010; Rocca et al., 2013).

Enfin, le pourcentage de cellule NK est fortement diminué chez les patients souffrant de myélome multiple (Guillerey et al., 2015).

La perte des fonctions NK semble donc être globale et non hiérarchisée contrairement à ce qui a été bien décrit pour les lymphocytes T (Wherry et al., 2003), bien que des études complémentaires soient nécessaires. En effet, peu de travaux se sont consacrés à étudier la notion de hiérarchisation dans la perte de fonction. Seule une étude a démontré que les cellules NK vont être orientées vers une perte

de fonction de manière progressive au cours de la pousse tumorale en analysant l'état des cellules NK à différents stades (de l'initiation de la tumeur à l'échappement de la tumeur au contrôle immunitaire) (Cong et al., 2018). Enfin, cette dysfonction est le résultat d'un processus actif comme l'a montré le groupe de Negrin (Gill et al., 2012). En effet, les cellules NK transférées dans des souris portant des tumeurs, perdent rapidement leur capacité à produire de l'IFN- $\gamma$ .

## 2- Diminution de l'expression des NKaR :

Une diminution de l'expression des NKaR est classiquement observée. Ainsi, Mamessier *et al.*, ont observé que les récepteurs NKp30, NKp46, NKG2D, 2B4, DNAM-1 et CD16 ont une expression réduite sur les cellules NK périphériques par comparaison avec des cellules NK de donneurs sains (Mamessier et al., 2011).

Dans l'infection par le VHB, les cellules NK des patients présentent une diminution de NKG2D ainsi que de la protéine adaptatrice DAP10 mais également du couple récepteur-adaptateur 2B4/SAP (Sun et al., 2012). NKp30, NKp36 et DNAM-1 sont également diminués chez les patients chroniquement infectés par le VHC (Bozzano et al., 2011). Dans un modèle murin de myélome multiple, l'absence de DNAM-1 accélère la progression de la maladie (Guillerey et al., 2015). Par ailleurs, l'existence de cellules DNAM-1<sup>-</sup> faiblement fonctionnelles chez des patients atteints de lymphome a récemment été démontrée (Stannard et al., 2019). Ces cellules se différencient à partir des cellules NK DNAM-1<sup>+</sup> et peuvent réguler négativement la fonctionnalité des cellules DNAM-1<sup>+</sup> notamment en terme de cytotoxicité.

## 3- Augmentation de l'expression des NKiR

Une autre caractéristique clé associée aux cellules NK non fonctionnelles ou peu répondeuses est l'expression élevée des NKiR tels que NKG2A, fortement augmentée dans les AML (Stringaris et al., 2014), dans le cancer du foie (Sun et al., 2017), et dans l'infection murine au VHB (Li et al., 2009b) et au VHC (Zhang et al.,

2019). Bien que les KIR ne soient pas surexprimés, leur blocage est associé à de meilleures fonctions NK pour le contrôle des AML (Ruggeri et al., 2002).

Les récepteurs de la famille des ICP sont également plus fortement exprimés à la surface des cellules NK et peuvent être co-exprimés (Gao et al., 2017; Seo et al., 2017a; Zhang et al., 2018b). Ils vont contribuer à inhiber les fonctions des cellules NK (Beldi-Ferchiou and Caillat-Zucman, 2017).

- **PD-1 :**

Comme les LT CD8<sup>+</sup>, les cellules NK peuvent exprimer le récepteur PD-1 suite à leur activation.

Chez la souris, PD-1 est exprimé à la surface des cellules NK dans différents modèles de tumeurs spontanées (EuMyc, TRAMP, Sarcome de Kaposi), transplantables (RMA, RMA-S, CT26, B16, C1498, 4T1) et induites génétiquement (p53, Kras) (Hsu et al., 2018). De plus, son expression est associée à une diminution sévère des fonctions NK et à la génération de tumeurs plus agressives (Hsu et al., 2018).

Chez l'homme, l'expression de PD-1 sur les cellules NK a notamment été rapportée dans le cas du myélome multiple (Benson et al., 2010), du sarcome de Kaposi (Beldi-Ferchiou et al., 2016) et du lymphome Hodgkinien (Vari et al., 2018). C'est aussi le cas pour les infections par le VHB (Li et al., 2018), par le VHC (Golden-Mason et al., 2008) et par le VIH (Norris et al., 2012).

- **TIGIT :**

Chez la souris, l'expression de TIGIT sur les cellules NK est retrouvée dans les modèles du mélanome B16, du cancer du côlon CT26, du cancer du sein 4T1 et du sarcome induit par MCA (Zhang et al., 2018b). TIGIT est préférentiellement exprimé par les cellules NK infiltrant la tumeur mais est également, à des niveaux moindres, sur les cellules NK de la rate, du foie et des poumons. Ces cellules TIGIT<sup>+</sup> présentent une production de cytokine diminuée (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) et une expression réduite de DNAM-1. En revanche, un plus grand pourcentage parmi ces cellules, exprime CD96, Tim-3 et Lag-3 (qui sont d'autres ICP) comparé aux cellules NK TIGIT<sup>-</sup>.

Enfin, au cours de l'infection par HCMV, les cellules NK adaptatives expriment faiblement TIGIT et sont résistantes à la suppression des fonctions induite par les

MDSC. En revanche, l'inhibition, par les MDSC, de la fonction des cellules NK conventionnelles peut être empêchée par le blocage de TIGIT *in vitro* (Sarhan et al., 2016).

- **CD96 :**

Peu d'études sont à ce jour disponibles concernant l'expression de CD96 sur les cellules NK. Nous venons de voir que ce récepteur peut être exprimé sur les cellules NK dans des modèles murins tumoraux (Zhang et al., 2018b) et son expression a également été mise en évidence sur les cellules NK infiltrant la tumeur chez des patients atteints de cancer du foie (Sun et al., 2018). La production d'IFN- $\gamma$  et de TNF- $\alpha$  par les cellules NK exprimant CD96 est altérée. De plus, un pourcentage important de cellules NK CD96<sup>+</sup> au site tumoral est corrélé à une diminution de la survie des patients. CD96 agit par compétition pour lier CD155, son ligand partagé avec DNAM-1 et TIGIT et bloque directement la fonction des cellules NK en limitant la production d'IFN- $\gamma$  (Chan et al., 2014). Les souris déficientes pour CD96 sont notamment plus résistantes à la formation de tumeurs induite par le MCA (Chan et al., 2014).

- **Tim-3 :**

Chez la souris, l'augmentation de l'expression de Tim-3 est notamment observée dans un modèle de tumeur déficiente pour le CMH de classe I (modèle TC-1, Seo et al., 2017). Ces résultats sont confirmés *in vitro* par co-culture des cellules NK et des cellules tumorales TC-1. L'expression de Tim-3 survient plus rapidement lorsque les cellules NK sont cultivées avec des cellules TC-1 déficientes pour le CMH-I qu'en présence de cellules normales. De plus, ce processus nécessite une interaction directe des cellules NK avec leurs cibles comme le montre l'absence d'expression de Tim-3 à la surface des cellules NK dans des expériences utilisant des « transwells ». Dans ce modèle la plupart des cellules NK Tim3<sup>+</sup> expriment également PD-1. Cependant, il existe tout de même des cellules simples positives comme cela avait été montré pour les lymphocytes T épuisés (Sakuishi et al., 2010). Les cellules Tim-3<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> présentent une perte dramatique de leurs fonctions effectrices (production de cytokine, dégranulation, expression de molécules cytotoxiques).



Chez l'homme, les cellules NK expriment constitutivement Tim-3 à l'inverse des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, mais son expression peut être augmentée comme c'est le cas chez les patients atteints de mélanome (da Silva et al., 2014). Les cellules NK circulantes de patients chroniquement infectés par le VHB expriment également Tim-3, ce qui est associé à une perte de fonction (Ju et al., 2010). En revanche, deux études présentent des résultats conflictuels *in vitro*. La première démontre une perte de fonction suite à l'engagement de Tim-3 par ses ligands (Ndhlovu et al., 2012) alors que la deuxième propose une augmentation de la sécrétion d'IFN- $\gamma$  en réponse à sa stimulation (Gleason et al., 2012). Son expression est également augmentée sur les cellules NK cultivées en présence d'IL-12, 15 et 18 suggérant que Tim-3 peut être considéré comme un marqueur de maturation (Ndhlovu et al., 2012).

En conclusion, le rôle de Tim-3 dans la perte de fonction NK n'est donc pas clairement défini.

- **Lag-3 :**

Très peu de données existent dans la littérature quant à l'expression de Lag-3 sur les cellules NK. Dans le modèle tumoral murin B16, CTLA-4, CD96 et Lag-3 sont détectés sur les cellules NK mais l'expression de Lag-3 se confine à un très faible pourcentage de cellules NK (Gao et al., 2017).

#### 4- Programme transcriptionnel et épigénétique :

Peu de données sont disponibles et aucune signature transcriptionnelle commune n'a été associée à la perte de fonction des cellules NK. En revanche, une étude a comparé les résultats de l'analyse transcriptomique des cellules NK périphériques de patients chroniquement infectés par le VHC, le VHB et le VIH (Boeijen et al., 2019). Cette étude met en évidence des profils transcriptionnels distincts même si l'expression des gènes était finalement peu modifiée dans les patients souffrant d'Hépatite B. Enfin, le phénotype dysfonctionnel s'accompagne d'une baisse d'expression de certains facteurs de transcription essentiels aux cellules NK comme T-bet et Eomes (Gill et al., 2012). De la même manière, les empreintes

épigénétiques caractéristiques des cellules NK en contexte de stimulation chronique n'ont pas été établies.

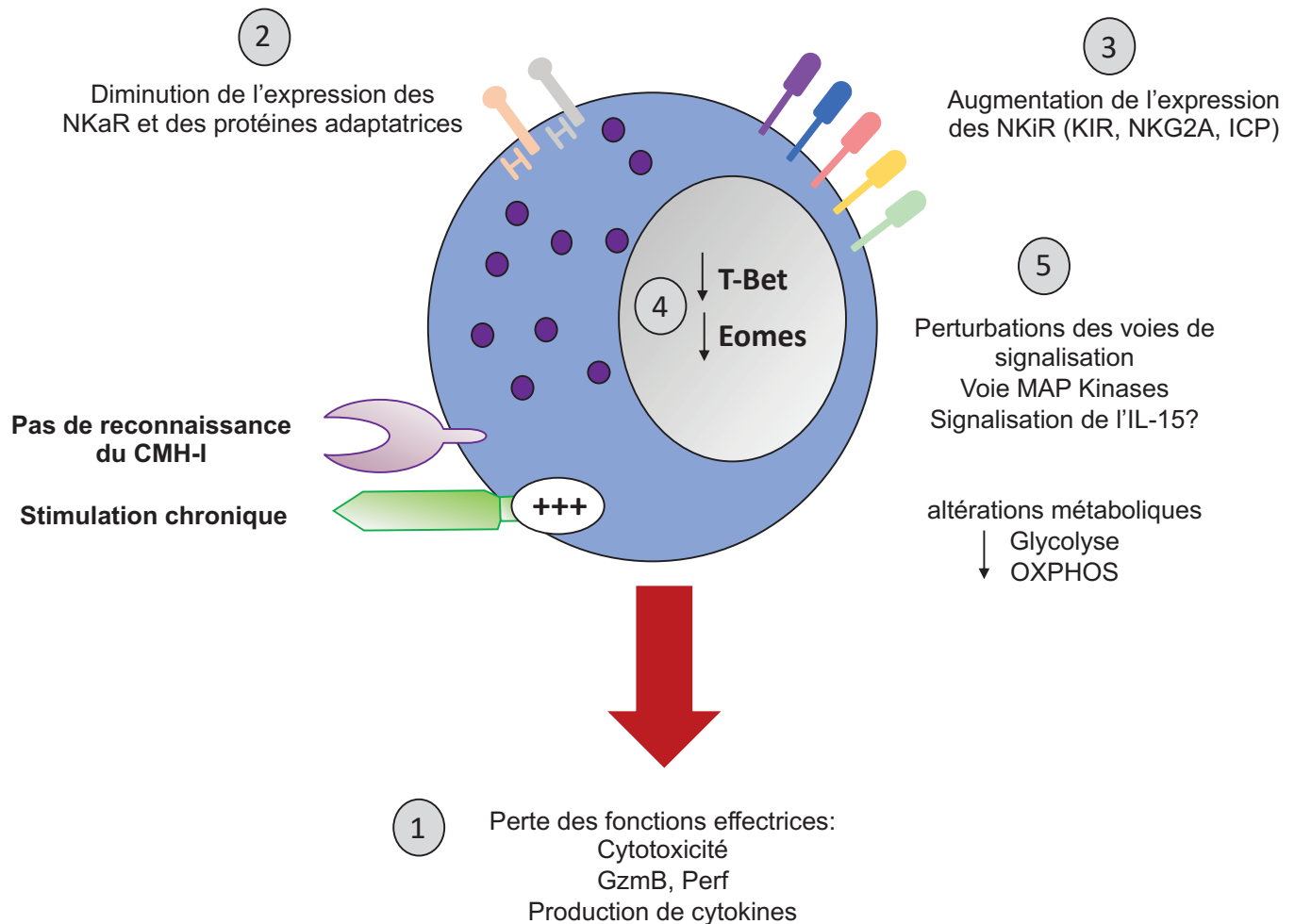
## 5- Altérations des voies de signalisation et du métabolisme :

Les cellules NK non répondeuses présentent certaines altérations au niveau des voies de signalisation et du métabolisme cellulaire. Par exemple, la signalisation en aval du récepteur de l'IL-15 est impactée par la pousse tumorale (Richards et al., 2006). De plus, l'impact de la pousse tumorale sur les voies permettant la survie et la prolifération des cellules NK a également été décrite dans le modèle de cancer du poumon induit par KRAS (Cong et al., 2018). Ici, les cellules sont peu marquées par Ki67 (marqueur de prolifération) et survivent moins bien après culture *ex-vivo* avec de l'IL-2. Leur nombre diminue également au niveau des poumons en fonction de la pousse tumorale et donc du stade de progression. Ceci est notamment associé à la hausse des niveaux de ROS dans le micro-environnement tumoral (TME). Les niveaux de phosphorylations des protéines Erk1/2 (pErk) sont réduits dans les NK infiltrant la tumeur, ce qui contribue à atténuer la production de cytokine (Seo et al., 2017a). De la même manière, dans le cancer du sein, l'activation de la voie mTOR est diminuée dans les cellules NK périphériques comme indiqué par des niveaux faibles de phosphorylation de S6 et 4EBP1 (Slattery et al., 2019).

Dans le modèle murin de cancer induit par KRAS, des expériences de SeaHorse ont permis de démontrer une profonde réduction de la glycolyse (mesure du taux d'acidification extracellulaire, extracellular acidification rate, ECAR) dans les cellules NK du poumon stimulées avec de l'IL-12 pendant 18h (Cong et al., 2018).

Chez l'homme, l'OXPLOS et la glycolyse ont été mesurées par SeaHorse dans des cellules NK de patientes atteintes d'un cancer du sein (Slattery et al., 2019). Bien que les niveaux de base n'étaient pas modifiés, les cellules NK présentent des altérations sévères après re-stimulation avec de l'IL-12 comparées à l'induction qui se produit dans des cellules NK de donneurs sains. D'autres défauts métaboliques ont pu être observés comme une masse mitochondriale plus importante, des niveaux de ROS produits élevés et des mitochondries désorganisées et fragmentées.

L'ensemble des caractéristiques des cellules NK dysfonctionnelles est présenté en **Figure 26**.



### **Figure 26: Caractéristiques des cellules NK dysfonctionnelles**

L'ensemble des études concernant les cellules NK en contexte chronique permettent d'identifier cinq caractéristiques : 1- perte des fonctions effectrices 2- diminution de l'expression des récepteurs activateurs 3- augmentation de l'expression de récepteurs inhibiteurs 4- modification de l'expression des facteurs de transcription et 5- perturbations des voies de signalisation et altérations métaboliques. Pour la plupart, elles sont similaires à ce qui se produit pour les lymphocytes T épuisés mais elles peuvent différer en fonction du contexte (type de tumeurs, type d'infections, modèle murin, patients...). Enfin, l'analyse des profils transcriptionnels et épigénétiques n'est, à ce jour, pas documentée.

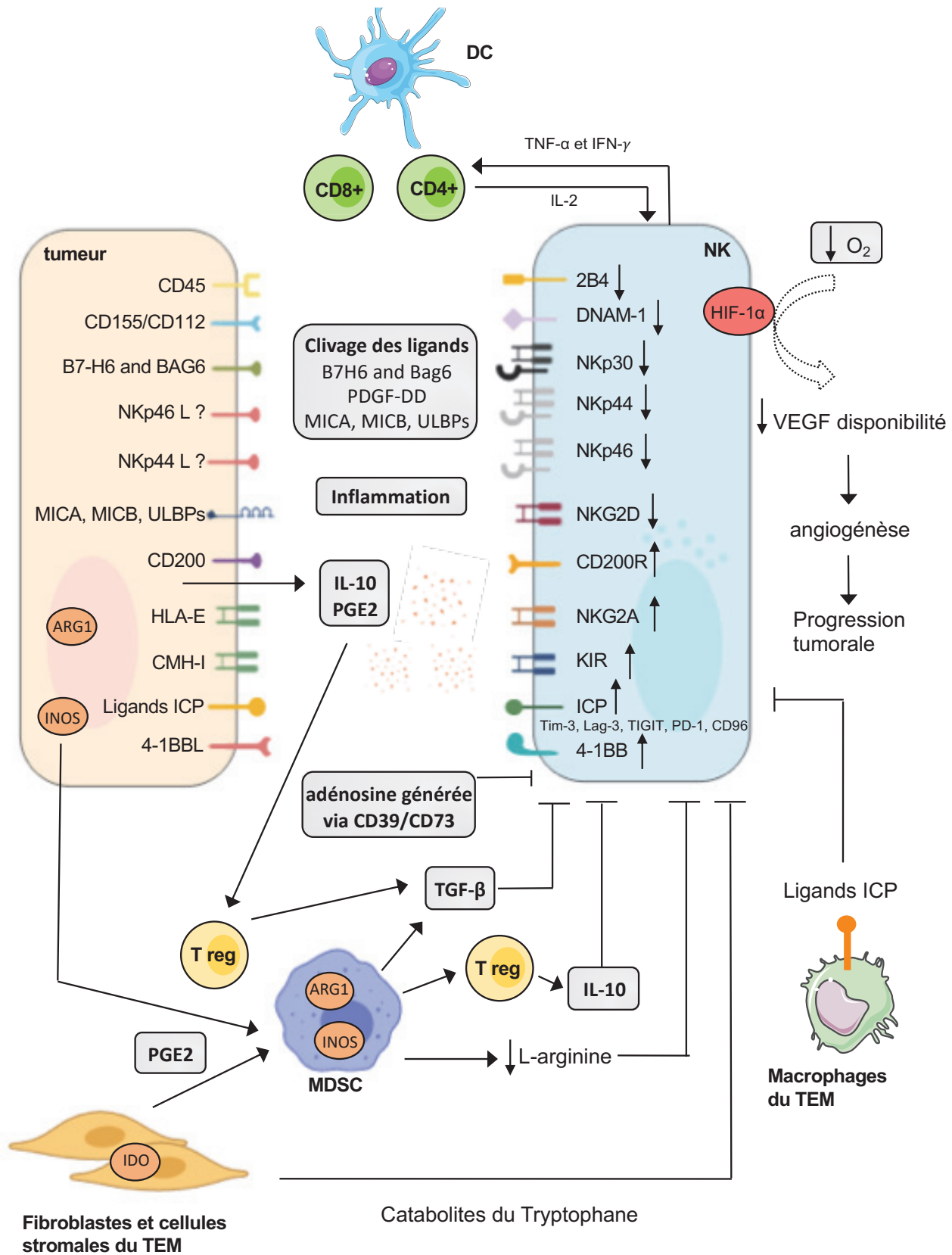
### 4.3.3 Causes et mécanismes moteurs de la dysfonction des cellules NK

Beaucoup d'études ont décrit un phénotype dysfonctionnel des cellules NK en contexte chronique, cependant les mécanismes conduisant à la tolérance NK demeurent peu caractérisés comparé à l'abondance des études concernant les LTCD8<sup>+</sup> épuisés. Cependant, comme c'est le cas pour les LTCD8<sup>+</sup>, ces mécanismes complexes sont multiples et peuvent être de nature intrinsèque ou extrinsèque à la cellule NK (Figure 27) :

#### 1- Stimulation chronique par les cibles

Comme nous l'avons vu plus haut dans ce manuscrit, les cellules tumorales surexpriment des ligands des NKaR tout en ayant perdu l'expression de ligands des NKiR. Elles vont donc continuellement stimuler les cellules NK.

Ce phénomène a tout d'abord été étudié *in vitro*. Ainsi, l'engagement chronique du récepteur NKG2D conduit à la diminution de la cytotoxicité des cellules NK (Coudert et al., 2008). La stimulation maintenue de NKG2D en culture par des cellules cibles irradiées RMA, modifiées pour exprimer H60, un ligand de NKG2D n'entraîne pas seulement l'inhibition de la voie en aval de ce récepteur mais inhibe également celles en aval d'autres récepteurs activateurs (qui dépendent des mêmes protéines adaptatrices que NKG2D) (Coudert et al., 2008). Une autre étude montre que le contact prolongé de cellules NK avec des cibles est responsable de la perte de fonction dans des expériences en temps réel (« time lapse ») (Khaznadar et al., 2014). Dans cette étude, les auteurs soulignent la baisse d'expression des récepteurs activateurs NKG2D et DNAM-1 et une réduction des fonctions cytotoxiques (dégranulation et pourcentage de lyse de cellules cibles) suite à des expériences de co-cultures de cellules NK avec des lignées de leucémie myéloïdes aiguës (THP-1 ou HL60) et de blastes primaires à différents temps.



Adapté de Chiossone et al., 2018 et réalisé avec l'aide de BioRender

### Figure 27: Causes et mécanismes moteurs de la perte de fonction NK

Les mécanismes intrinsèques et extrinsèques conduisant à la perte de fonction des cellules NK sont résumés ici.

Un modèle largement utilisé *in vivo* est le modèle RMA-S. Ces cellules dérivent de la lignée de thymome RMA induite par le virus de Rauscher. Les RMA-S sont porteuses d'une mutation dans le transporteur de peptide TAP2, ce qui induit une perte quasi complète de l'expression des molécules de CMH-I (Ljunggren et al., 1991). Ainsi contrairement à la lignée parentale RMA qui ne stimule pas les cellules NK, la lignée RMA-S active les fonctions NK (S pour Sensibles à la lyse NK). A la différence des cellules RMA, l'implantation de ces tumeurs par voie sous-cutanée chez la souris a permis de mettre en évidence une perte de fonction (production d'IFN- $\gamma$  et dégranulation) des cellules NK après restimulation *ex vivo* avec des cibles (YAC) ou des anti NKaR (anti NK1.1, anti NKp46) (Ardolino et al., 2014). Le fait que seules les RMA-S induise cette épuisement fonctionnel souligne le rôle de la stimulation chronique dans ce phénomène. Dans ce contexte, la perte de fonction est associée à une diminution de la phosphorylation de Erk et donc de l'activation de la voie MAP Kinases (Ardolino et al., 2014).

D'autres modèles de tumeurs déficientes pour les molécules de classe I et donc stimulant les cellules NK ont également été utilisés pour étudier la perte de fonction en cas de stimulation chronique. L'injection par voie intraveineuse de cellules métastatiques TC-1 CMH-I négatives révèle une profonde perte de fonctions des cellules NK au cours de la progression tumorale et est associée à l'expression de Tim-3 et de PD-1 et à la diminution de pErk chez la souris (Seo et al., 2017a).

Enfin, la stimulation chronique des récepteurs NK peut être causée par des ligands solubles non présentés par une cible. Par exemple, les ligands de NKG2D peuvent être présents sous une forme soluble (une fois clivés par des métallo protéinases exprimées par les cellules tumorales) et servent de leurre pour conduire à l'internalisation du récepteur NKG2D (Hilpert et al., 2012). Néanmoins, un papier a mis en évidence l'effet bénéfique du ligand de NKG2D, MULT1 qui sous sa forme soluble permet en fait le rejet par les cellules NK des tumeurs formées à partir de B16 (Deng et al., 2015).

## 2- Exposition aux cytokines pro-inflammatoires

La persistance d'une stimulation chronique (*ie* via un antigène ou des cellules tumorales) va conduire à une forte inflammation qui peut également être responsable de la diminution des fonctions effectrices des cellules NK. Une forte inflammation

sous-entend des niveaux élevés de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-15 ou l'IL-2. Ainsi, *in vivo chez la souris*, lorsque des cellules NK pré-stimulés avec de l'IL-15 sont soumises à un deuxième cycle de stimulation, elles présentent des défauts dans la prolifération et l'activation (Frutoso et al., 2018). En effet, une stimulation prolongée (comparée à une stimulation alternée) avec de l'IL-15 va conduire à une diminution du potentiel cytotoxique des cellules NK et de leur fonctions anti-tumorales *in vivo* (Felices et al., 2018). Le facteur testé (la cytokine pro-inflammatoire IL-15) est isolé dans cette étude ce qui permet de déterminer son seul impact. L'autre intérêt de cette étude est que les résultats suggèrent une situation paradoxale puisque l'IL-15 était jusqu'alors connue pour induire les fonctions NK et est utilisée en clinique. On s'aperçoit ici qu'en traitement chronique, les effets peuvent être néfastes. Ce traitement continu avec de l'IL-15 induit une diminution de la viabilité et de la prolifération, une baisse d'activation de la voie mTOR et conduit à de profonds défauts métaboliques en diminuant l'oxydation des acides gras et donc la capacité respiratoire des mitochondries. On peut noter également que des souris modifiées génétiquement pour sur-exprimer la cytokine IL-15 développent spontanément des leucémies associées à une perte de fonction des cellules NK (Fehniger et al., 2001).

Des données récemment publiées identifient les changements dans le phénotype des cellules NK après quatre types de stimulation chroniques *in vivo* (IL-15, IL-2, poly I:C et infection par MCMV). Les auteurs identifient dans cette étude une signature transcriptionnelle associée à une perte de fonction et comprenant la diminution de l'expression de Eomes et NKG2D mais l'augmentation de KLRG1 (Alvarez et al., 2019). Au cours de l'activation, les cellules NK semblent subir des dommages au niveau de l'ADN. L'augmentation de l'expression de MULT-1 un ligand de NKG2D est corrélé avec ces dommages et conduit à l'internalisation de NKG2D par les cellules NK. Les dommages à l'ADN sont d'ailleurs connu pour induire l'expression des ligands de NKG2D (Gasser et al., 2005). L'utilisation de traitement activant la voie de réparation à l'ADN permet alors de maintenir l'expression de NKG2D, d'induire des gènes de survie et de diminuer la perte de fonction (Alvarez et al., 2019).

### 3- Expression de récepteurs inhibiteurs et notamment d'ICP

Comme nous l'avons vu, les cellules NK peuvent exprimer différents ICP (PD-1, Tim-3, Lag-3, TIGIT) ou autres NKiR. Les cellules tumorales ainsi que certaines cellules immunitaires du TME régulent positivement l'expression des ligands des NKiR tels que HLA-E, PDL-1, Galectin-9, CD155, les E et N cadhérines et CD200 (ligand de CD200R, un autre NKiR) (André et al., 2018; Coles et al., 2011; Souza-Fonseca-Guimaraes et al., 2019).

Le blocage de PD-1 contribue à restaurer l'activité des cellules NK dans différents modèles tumoraux (Hsu et al., 2018) et le blocage de TIGIT permet également de restaurer les fonctions NK et améliore l'effet de la thérapie anti PD-1/anti PDL-1 dans plusieurs modèles (tumeurs solides CT26, MCA ou métastatiques B16 et 4T1) (Zhang et al., 2018b).

De la même manière, un traitement permettant de bloquer Tim-3 dans le mélanome chez l'homme contribue à contrer l'état d'épuisement des cellules NK (da Silva et al., 2014). Chez les patients chroniquement infectés par le VHC, le blocage de NKG2A permet d'améliorer les fonctions NK (Zhang et al., 2019). De plus, les thérapies utilisant le monalizumab (anti NKG2A), augmentent les fonctions effectrices NK dans des souris porteuses du lymphome B dérivé des cellules A20 mais également chez l'homme dans le traitement du cancer épidermoïde de la tête et du cou (SCCHN) comme cela a été rapporté dans un essai clinique de phase II (André et al., 2018).

Le blocage des NKiR semble donc être une perspective prometteuse pour le traitement de certaines tumeurs malignes et signifie que les cellules « épuisées » n'ont pas perdu toute fonction effectrice.

En 2018, le groupe de David Raulet a utilisé une série de lignées parentales CMH-I négatives comparées à leurs homologues déficientes pour l'expression de PDL-1. Leurs résultats démontrent une diminution plus drastique de la production d'IFN- $\gamma$  *ex vivo* par les cellules NK provenant de souris porteuses de tumeurs PDL-1<sup>-</sup> (Hsu et al., 2018). De plus, les cellules PD-1<sup>+</sup> semble être les plus actives lorsqu'elles sont restimulées *ex vivo*. L'ensemble de ces résultats suggèrent donc que PD-1 constitue préférentiellement un marqueur d'activation, certainement protecteur des fonctions effectrices en tempérant l'activation et sous-entend le côté paradoxal de l'activation.



En effet, il semblerait qu'une activation trop prononcée et maintenue dans le temps est délétère pour les fonctions effectrices des cellules NK et fini par conduire à leur tolérance vis-à-vis des cibles à tuer. Ceci corrobore la connaissance que nous avons de l'éducation. En effet, les cellules les plus actives après re-stimulation sont celles exprimant des NKiR car elles sont protégées d'une stimulation chronique désensibilisatrice.

#### 4- Autres points de contrôles inhibiteurs

- CIS (cytokine inducible SH2)

CIS, codée par Cish, est une protéine régulatrice, rapidement induite en réponse à l'IL-15 et impliquée dans une boucle de rétrocontrôle négatif (Delconte et al., 2016). Le mécanisme exact d'inhibition n'est pas clair mais il est proposé que CIS présente un domaine ubiquitine ligase et peut ainsi cibler les protéines de la voie de signalisation en aval du récepteur à la dégradation par le protéasome (Zhang et al., 1999). Des travaux ont montré que les souris Cish<sup>-/-</sup> ont une activité métastatique plus forte contre les métastases issues de modèle mélanome (B16), de cancer de la prostate (RM-1) ou du sein (E077.1) que les souris sauvages (Delconte et al., 2016) et identifient ainsi CIS comme une cible thérapeutique potentielle pour améliorer les fonctions NK.

- IL-1R8

Le récepteur 8 à l'IL-1 (IL-1R8) a récemment été, lui aussi, identifié comme un point de contrôle inhibiteur de la fonction NK via l'inhibition de la signalisation par l'IL-18. Les souris déficientes pour l'IL-1R8 sont plus résistantes à la formation de métastases et à l'infection MCMV (Molgora et al., 2017).

- KLRG1

Le rôle de KLRG1 est encore mal caractérisé. D'abord considéré comme un marqueur de maturation terminale voire de sénescence des cellules NK, il a également un rôle inhibiteur comme évalué chez des patients chroniquement infectés par le VHC où les faibles fonctions cytotoxiques sont associées à un niveau

fort d'expression de KLRG1 pouvant inhiber la voie PI3K (Wang et al., 2013). Des plus, les souris KLRG1<sup>-/-</sup> (défiance réalisée dans les cellules NK spécifiquement) développent moins de métastases B16 que les souris non mutées (observations non publiées du laboratoire de L. Brossay, Université de Brown présentées au congrès « Innate and non classical innate cells in cancer immunotherapy », Mars 2019, Keystone, Etats-Unis).

- **Adaptateurs de signalisation**

Comme nous l'avons vu, l'infection chronique par HCMV conduit à la génération de cellules NK adaptatives. Ces cellules perdent notamment leur capacité à répondre à des re-stimulations par IL-12/18 et à lyser leurs cellules cibles *ex vivo*. Dans ce cas particulier, il a été montré l'existence de sous-groupes négatifs pour l'expression de protéines adaptatrices spécifiques des lymphocytes B ou des cellules myéloïdes et exprimées par les cellules NK telles que FC $\epsilon$ R $\gamma$ , Syk et Eat-2 et une baisse d'expression du facteur de transcription PLZF (promyelocytic leukemia zinc finger) associée à la perte de réponse (Schlums et al., 2015). Ces cellules négatives pour au moins une des protéines adaptatrices, présentent une hyper-méthylation au niveau de certains promoteurs de ces gènes régulant ainsi leur phénotype.

Aucun changement dans l'expression de CD3, Zap70 et SAP (autres protéines adaptatrices spécifiques des LT et exprimées par les NK), n'a été observé.

## 5- Éléments immunosuppresseurs du TME

Comme les LT CD8<sup>+</sup>, les cellules NK peuvent être régulées négativement par l'environnement cellulaire et cytokinique suppresseur de la tumeur.

- **Cellules immunosuppresseives**

Plusieurs types cellulaires peuvent être impliqués. Les MDSC peuvent inhiber la cytotoxicité et la production d'IFN- $\gamma$  par les cellules NK ainsi que l'expression de certains récepteurs. Cet effet serait dépendant du TGF- $\beta$  présenté à la membrane des MDSC (Li et al., 2009a). Les neutrophiles, qui partagent de nombreuses

caractéristiques avec les MDSC et qui sont difficilement dissociables sont d'ailleurs connus pour favoriser la tumeur en promouvant l'inflammation (Pekarek et al., 1995). De plus, chez l'homme, la protéine de surface (HBsAg) du VHB peut contribuer à la génération de monocytes immunosuppresseurs exprimant PDL-1 et HLA-E qui vont interagir avec les cellules NK via PD-1 et NKG2A pour induire un phénotype régulateur (Li et al., 2018). Ceci va déclencher la production d'IL-10 par les cellules NK régulant la réponse T et contribuant ainsi à la persistance du virus. Bien que probablement impliqués, le rôle des T reg dans la suppression des cellules NK est mal caractérisé et passe certainement par la production de TGF- $\beta$ .

- TGF- $\beta$

Des niveaux de cytokines anti-inflammatoires, comme le TGF- $\beta$ , anormalement élevés ont été retrouvés au niveau du TME (Li et al., 2006) mais aussi dans le sérum de patients infectés par le VHB (Sun et al., 2012). Des travaux de l'équipe ont par ailleurs démontré une meilleure élimination de métastases B16 chez des souris déficientes pour l'expression du récepteur au TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ R2, délétion spécifique aux cellules NK) démasquant ainsi le rôle régulateur négatif de cette cytokine (Viel et al., 2016). Comme pour les lymphocytes T CD8, le TGF- $\beta$  exerce des fonctions immunosuppressives sur les cellules NK (Ghiringhelli et al., 2005).

Concernant les pistes moléculaires impliquées, son rôle dans la perte de fonction des cellules NK semble passer par différentes voies. Tout d'abord, le TGF- $\beta$  est connu pour diminuer l'expression de T-bet et pour bloquer l'activation de la voie mTOR (Viel et al., 2016). Il peut donc ainsi impacter le métabolisme cellulaire comme c'est le cas dans le cancer du sein où le TGF- $\beta$  semble induire de profonds défauts au niveau des mitochondries (Slattery et al., 2019). Cependant, les conclusions de cet article sont à prendre avec précautions car le traitement *in vitro* avec du TGF- $\beta$  ne récapitule pas l'ensemble des défauts métaboliques observés chez les patients.

De plus, le TGF- $\beta$  peut induire la conversion des cellules NK (CD49a<sup>-</sup>CD49b<sup>+</sup>) en ILC-1 intermédiaires (CD49a<sup>+</sup>CD49b<sup>+</sup>) et en ILC-1 (CD49a<sup>+</sup>CD49b<sup>-</sup>) au sein de la tumeur dans le modèle de sarcome induit par le MCA (Gao et al., 2017).

Enfin, il a été montré que le TGF- $\beta$  peut augmenter l'expression de la fructose 1,6-biphosphatase (Fbp1) dans les cellules NK au niveau de la tumeur, une enzyme clé

qui facilite la néoglucogenèse mais inhibe la glycolyse et augmente la sécrétion de ROS (Cong et al., 2018). Cependant, ces résultats sont à prendre avec prudence. Il est possible que les échantillons soient contaminés par d'autres cellules exprimant FBP1 car cette enzyme ne semble pas exprimée par les cellules NK mais est au contraire fortement exprimée dans le poumon (données disponibles sur la base de données Immgen), tissu dans lequel la tumeur utilisée dans cette étude se développe.

On peut également noter le rôle de l'activine A dans le contrôle des fonctions des cellules NK. Cette protéine appartenant à la superfamille du TGF- $\beta$  est produite par les DC et peut inhiber la production d'IFN- $\gamma$  par les cellules NK (Robson et al., 2009).

- Adénosine

Les cellules NK expriment également le récepteur à l'adénosine A2AR ainsi que l'ecto-enzyme CD39 et pourraient donc être sensibles aux effets immunosuppresseurs induits par l'adénosine, que nous avons décrits plus haut.

- Hypoxie

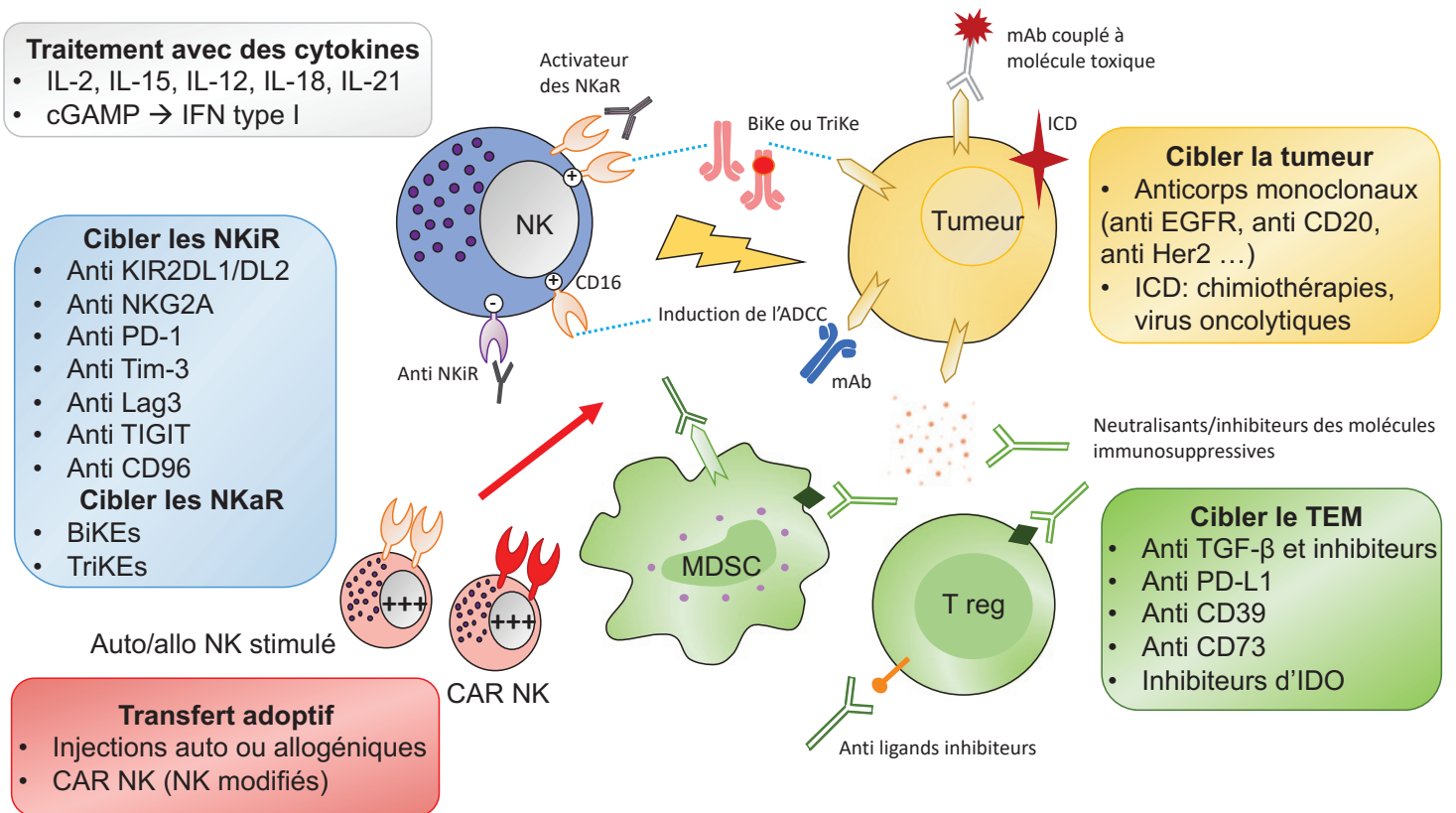
Un autre élément inhibiteur du TME qui participe à la perte de fonction est le niveau d'oxygénation (très faible au niveau des tumeurs par rapport au sang périphérique par exemple). En effet, l'hypoxie impacte l'expression des NKaR et réduit les fonctions cytotoxiques (Balsamo et al., 2013). En conditions hypoxiques, le facteur 1 induit par l'hypoxie (HIF-1 $\alpha$ ) est exprimé, or ce facteur a un effet suppresseur de l'activité des cellules NK comme cela a pu être montré en utilisant des souris déficientes pour HIF-1 $\alpha$  dans un modèle tumoral RMA-S (données non publiées du laboratoire d'A. Cerwenka présentées au congrès « Innate and non classical innate cells in cancer immunotherapy », Mars 2019, Keystone, Etats-Unis). Il faut cependant signaler un effet paradoxal pro-métastatique de la délétion d'HIF-1 $\alpha$  dans les cellules NK. En effet, la perte d'HIF-1 $\alpha$  diminuerait la production par les cellules NK de VEGFR1, le récepteur au facteur de croissance endothélium vasculaire (VEGF). Ce facteur est normalement séquestré par son récepteur soluble. La suppression d'HIF-1 $\alpha$  augmenterait donc la disponibilité de VEGF qui est capable de promouvoir l'angiogenèse (Krzywinska et al., 2017).

## 4.4 Immunothérapies utilisant les cellules NK

Le fait que l'épuisement T puisse être contrôlé par le blocage de la voie PD-1 dans le modèle LCMV fut une découverte majeure (Barber et al., 2006) et les immunothérapies permettant de revigorer les LT ont constitué une révolution pour le traitement de certains cancers. Les études pionnières ayant menées à la découverte des cibles CTLA-4 et PD-1 ont d'ailleurs values le prix Nobel de médecine en 2018 aux Pr Allison et Honjo. Le premier anticorps ayant reçu l'autorisation de mise sur le marché par l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux, la FDA (Food and drug administration), est l'ipilimumab, un anti-CTLA-4 dans le traitement du mélanome en 2011. En 2014, deux anti-PD-1 (pembrolizumab et nivolumab) reçoivent eux aussi l'autorisation de la FDA. Depuis, l'abondance de papiers dans la littérature concernant les thérapies anti-ICP combinées ou non entre-elles ou aux chimiothérapies et les essais cliniques en cours démontrent bien leur incroyable potentiel et le bénéfice considérable apporté sur la survie des malades. L'effet positif de ce type de thérapie a ensuite été rapporté dans d'autres types d'infections (VHB, VHC et VIH) ainsi qu'en contexte tumoral comme nous l'avons décrit plus haut (McLane et al., 2019).

Cependant, de nombreux patients ne répondent pas aux immunothérapies existantes puisque certaines tumeurs sont résistantes à ce type de traitement (Restifo et al., 2016).

Les causes probables de l'échec du traitement sont liées à la tumeur elle-même et à la sélection de variants résistants et plus agressifs, à l'état du système immunitaire et au manque d'infiltration de la tumeur par les cellules immunitaires. Proposer de nouvelles cibles thérapeutiques est donc essentiel pour parvenir à traiter ces patients résistants et les cellules NK constituent une cible thérapeutique de choix pour différentes raisons. En effet, ceux-ci ne nécessitent pas de sensibilisation préalable par l'antigène, à l'inverse des LT. Ainsi, on s'attend à ce que la tumeur puisse être reconnue par presque 100% des cellules NK infiltrantes alors que seul 0,001 à 10% des lymphocytes T sont spécifiques des néo-antigènes tumoraux (Linnemann et al., 2013).



Adapté de Chiossone et al., 2018

### Figure 28: Approches thérapeutiques visant à revigorer les cellules NK

Différents types de traitements visant à revigorer les cellules NK sont actuellement développés ou mis sur le marché. Ils peuvent cibler les NK, la tumeur, ou le TEM. Les traitements visant directement les cellules NK sont des anticorps ciblant les NKiR ou les NKaR, des thérapies à base de cytokines activatrices ou encore des injections de cellules NK préalablement activés ou modifiées.

Le réservoir de cellules NK pouvant être ciblé est donc bien plus important que le réservoir T d'où l'importance de mieux comprendre les régulations qui interviennent dans la perte de fonction des cellules NK en contexte chronique. D'après une recherche sur le site [clinical trial.gov](https://clinicaltrials.gov) (en Juin 2019, mots clés : « clinical trials and T cells » ou « clinical trials NK cells »), on dénombre 3814 essais cliniques en cours ciblant les lymphocytes T alors que l'on peut ne peut recenser que 438 essais cliniques orientés sur les cellules NK (186 en phase I, 222 en phase II, 18 en phase III et 9 en phase IV). Parmi elles, 423 sont interventionnelles et 15 sont observationnelles (<https://clinicaltrials.gov>). Les cellules NK sont donc peu ciblées comparées aux LT mais la recherche actuelle se focalise de plus en plus sur différentes modalités permettant de les cibler (revues de Chiossone et al., 2018 et Souza-Fonseca-Guimaraes et al., 2019). Ces modalités sont illustrées en **Figure 28** et vont maintenant être précisés.

- Cibler les NKiR :

Un moyen de restaurer l'activité des cellules NK est de cibler les NKiR. L'effet d'un blocage de la voie PD-1/PDL-1 sur les cellules NK a notamment été évalué à plusieurs reprises dans différents modèles murin ou chez l'homme et conduit à une amélioration de la survie (Benson et al., 2010; Hsu et al., 2018).

D'autres NKiR peuvent également être bloqués en combinaison ou non avec les thérapies anti PD-1/PDL-1 tels que NKG2A (André et al., 2018, étude chez la souris et chez l'homme), Tim-3 (da Silva et al., 2014, étude chez l'homme *in vitro*) et TIGIT (Zhang et al., 2018b, chez la souris). Certaines études suggèrent également le bénéfice que des thérapies bloquant CD96 (Chan et al., 2014) ou Lag-3 (Merino et al., 2019) pourraient apporter. Enfin, des anti-KiR ont été utilisés dans le traitement des AML et du myélome et bien que les effets semblaient prometteurs *in vitro* et chez la souris (Romagné et al., 2009), un essai clinique de phase II récemment réalisé avec le lirilumab (anti KIR2DL1/DL3) n'a pas conduit aux mêmes conclusions (Vey et al., 2017) et montre plutôt l'inverse. Ceci pourrait notamment être lié à un problème de « dés-éducation » rendant les cellules NK non fonctionnelles.

Moduler l'activation de KLRG1 est également proposé mais aucune donnée n'est, pour l'instant, disponible dans la littérature.



- Cibler les NKaR :

Une autre approche consiste à cibler les NKaR en engageant ou co-engageant certains récepteurs. C'est le cas des thérapies basées sur des anticorps bispécifiques (BiKEs, bispecific killer cell engagers) ou trispécifiques (TriKEs, trispecific killer cell engagers) engageant les cellules NK et leur cible (Souza-Fonseca-Guimaraes et al., 2019). Les BiKEs sont créés par fusion d'un fragment variable dirigé contre certains antigènes exprimés par la tumeur avec un site de reconnaissance permettant la fixation au récepteur CD16. Cela nécessite donc que la tumeur exprime un antigène connu. Cet anticorps bispécifique augmente ainsi la reconnaissance des cibles tumorales par les cellules NK en complétant les signaux issus d'autres récepteurs présents à la surface des cellules NK (NCR, NKG2D, DNAM-1). Les TriKEs sont des versions améliorées par l'ajout de la cytokine IL-15 liée au BiKE afin de favoriser la survie, l'activation et la fonctionnalité des cellules NK. Cette combinaison va ainsi permettre de diminuer le seuil d'activation de la cellule NK en plus de rapprocher physiquement les cibles. L'utilisation d'un anticorps trispécifique CD16-IL-15-CD33 dans le traitement des AML a permis de démontrer leur effet prometteur (Felices et al., 2016). A noter que des effets néfastes peuvent être attendus au vu de ce que nous avons déjà discuté plus haut concernant l'engagement chronique des récepteurs ou la stimulation chronique par l'IL-15. Enfin, un autre type d'anticorps trispécifique engageant CD16, NKp46 et dirigé contre un antigène tumoral (nommé NKCE pour « « trifunctional specific NK cell engagers » ») a également prouvé son efficacité contre l'implantation de tumeurs (type lymphome B par utilisation de cellules Raji) *in vitro* et *in vivo* dans des modèles de tumeurs solides et disséminées (Gauthier et al., 2019).

- Modulation par les cytokines :

L'utilisation des cytokines pour le traitement de souris porteuses de tumeurs CMH-I négatives améliore leur survie et réactive le potentiel anti-tumoral des cellules NK. Dans le modèle 4T1, un traitement *ex vivo* par la cytokine IL-21 peut restaurer la fonction NK et améliorer la survie des souris en thérapie *in vivo*. Cet effet est notamment permis par rétablissement des voies STAT1 et PI3K. Dans un autre modèle (RMA-S), la survie des souris est prolongée par traitement avec les cytokines



IL-12/18 ou encore avec la superkine H9, une version mutée de l'IL-2 qui fonctionne indépendamment de la chaîne  $\alpha$  de l'IL-2R, l'effet étant plus important avec ce dernier traitement (Ardolino et al., 2014). De plus, l'IL-12 en combinaison avec des thérapies anti-ICP permet de revigorer les fonctions NK (Ohs et al., 2017). L'IL-2 était une des premières immunothérapies utilisées mais au vu de sa forte toxicité, l'IL-15 qui signale via le même récepteur et qui a des effets comparables, lui est maintenant préférée. La stimulation préalable de cellules NK CD56<sup>bright</sup> de patients AML avec de l'IL-15 augmente leurs capacités cytotoxiques et leur potentiel anti-tumoral en re-stimulation *ex vivo* mais induit l'expression d'ICP sur ces cellules ce qui suppose que les traitements IL-15 doivent être utilisés en combinaison avec des anti-ICP (Wagner et al., 2017). Le bénéfice d'injections d'IL-15 en combinaison ou non avec un traitement anti CTLA-4 sur le potentiel anti-tumoral des lymphocytes est actuellement évalué dans des essais cliniques impliquant des patients atteints de différents types de cancer (Conlon et al., 2015).

D'autres thérapies ciblent la voie IFN de type I (revue de Souza-Fonseca-Guimaraes et al., 2019), un puissant activateur des cellules NK, dont l'effet majeur passe probablement par l'IL-15. De plus, l'IFN de type I permet la sécrétion de ligands CXCL9/10 et 11 qui contrôle le trafic des NK en condition inflammatoire en se liant au récepteur CXCR3 sur les cellules NK (Grégoire et al., 2008), les recrutant ainsi au site inflammatoire. Un moyen d'amplifier cette voie est d'agir sur STING (stimulator of interferon genes protein) (Marcus et al., 2018). Les cellules tumorales produisent l'enzyme cGAS qui est activée par l'ADN cytosolique et va pouvoir catalyser la synthèse de 2'3'-cGAMP qui est ensuite transféré aux cellules myéloïdes du TEM. La molécule cGAMP active STING, ce qui va déclencher la production d'IFN de type I améliorant ainsi l'activité des cellules NK. Une récente étude a permis de montrer le bénéfice d'injection de cGAMP au site de la tumeur dans la production d'IFN de type I et dans le rejet des tumeurs RMA-S par les cellules NK qui voient leur potentiel cytotoxique fortement augmenter (Marcus et al., 2018).

Enfin depuis quelques années, la recherche développe des thérapies basées sur l'induction de mort cellulaire (ICD : induced cell death) qui serait immunogène, pour stimuler le système immunitaire (revue de Galluzzi et al., 2017). En effet, les molécules utilisées en chimiothérapie induisent la lyse des cellules tumorales et ainsi

le relargage de motifs de danger, les DAMPS (danger associated molecular pattern) tels que la calreticuline, l'ATP extracellulaire, HMGB1 ou encore ANXA1. Ces derniers permettent l'activation des PRRs (Pattern Recognition receptors) ce qui déclenche l'inflammation et augmente la production d'IFN de type I. Certaines de ces molécules sont déjà décrites pour cibler les lymphocytes T épuisés et constituent donc des candidats potentiels pour le recrutement des cellules NK au site tumoral. Cet objectif serait particulièrement désirable pour les cancers ayant perdu l'expression des molécules de CMH de classe I.

Dans le même ordre d'idée, les virus oncolytiques ciblant la tumeur apparaissent également comme une stratégie prometteuse. En effet, en plus de leur effet anti-tumoral direct, ils augmentent l'inflammation et ainsi la production de chimiokines permettant le recrutement des lymphocytes et de cytokines pro-inflammatoires (IL-15, IFN de type I) permettant leur activation. L'utilisation de ce type de virus dans le traitement du mélanome en combinaison avec un anti PD-1 a prouvé leur efficacité pour revigorer les LT (Ribas et al., 2017), ce qui pourrait être transposé aux cellules NK.

- Transfert adoptif :

Les cellules NK injectées peuvent avoir différentes sources. Elles proviennent de cellules primaires (autologues (du patient) ou hétérologues), d'iPSC (induced pluripotent stem cells) différenciées *in vitro* ou encore de lignées cellulaires comme par exemple la lignée transformée NK92 (Souza-Fonseca-Guimaraes et al., 2019). L'injection de cellules NK autologues ou allogéniques est actuellement testée dans le traitement de certains cancers notamment le myélome. L'expansion *in vitro* des cellules NK de patients ou de donneurs sains se fait par utilisation des cytokines IL-2, IL-12, IL-18, IL-15 et IL-21 et peut être aidée par la présence de cellules « feeders » (Souza-Fonseca-Guimaraes et al., 2019). Les cellules NK ainsi cultivées dans des bioréacteurs pendant plusieurs semaines sont ensuite réinjectées au patient selon des schémas d'injection variables (dose, fréquence d'injections...). De nombreuses stratégies permettant d'améliorer la culture, l'expansion, la stimulation préalable des cellules NK sont en cours de test.

Depuis quelques années, de nouvelles immunothérapies ont émergé et sont basées sur la modification génétique des lymphocytes et la génération de CAR (chimeric antigen receptor) (Yong et al., 2017). L'approbation de la FDA pour l'utilisation d'un CAR T (chimeric antigen receptor T cell) spécifique de CD19 dans le traitement des leucémies et du lymphome B (Pehlivan et al., 2018) ainsi que les nouvelles technologies comme le système CRISPR/Cas9 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats) ouvrent également de nouvelles portes concernant les cellules NK. Les possibilités de modifier génétiquement des cellules NK en culture avant de les réinjecter sont nombreuses et prometteuses. Ainsi, l'identification de nouveaux candidats pouvant être ciblés dans les cellules NK et conduire à une amélioration du potentiel anti-tumoral (meilleure expansion, survie, reconnaissance de la cible, activation, prévention de l'épuisement) apparaît comme essentielle. De plus, les cellules NK présentent des avantages par rapport à l'utilisation de LT qui peuvent être à la base de maladies de type greffe contre l'hôte (GvHD) responsables de sérieux dommages aux tissus. Le syndrome de CRS (pour « cytokine release syndrome ») et de GvHD qui peut survenir en cas de transfert allogénique est considérablement réduit par l'utilisation de cellules NK.

Cependant, les limites majeures de ce type de traitement sont le manque d'efficacité pour les tumeurs solides et le prix conséquent de ces thérapies personnalisées.

- Cibler la tumeur et le TEM :

Pour conclure, on peut citer d'autres thérapies visant à améliorer la fonction des cellules NK.

Ces perspectives de traitement cherchent à cibler la tumeur en elle-même via par exemple, l'utilisation d'anticorps monoclonaux (mAb) qui vont engager le récepteur CD16 à la surface des cellules NK et déclencher l'ADCC ou encore à cibler le TEM. Les thérapies utilisant des mAbs tels que le Rituximab (anti-CD20) ou le Trastuzumab (anti-Her2) sont majeures et utilisées en clinique en routine (Chiavenna et al., 2017). Certaines études démontrent l'efficacité de bloquer le clivage des ligands des NKaR pour empêcher la libération d'une forme soluble qui sert de leurre. D'autres mécanismes impliqués dans la dysfonction des cellules NK sont ciblés. L'utilisation d'anti-CD39 et d'anti-CD73 en combinaison avec un anti-PD-1 améliore

la survie des souris dans le modèle B16 ou induit par le MCA mais cet effet semble être plutôt dépendant des lymphocytes T et non des cellules NK (Perrot et al., 2019). Enfin, certaines drogues médicamenteuses offrent également la possibilité de moduler la fonction des cellules NK au sein du TME comme par exemple des inhibiteurs du TGF- $\beta$ , des inhibiteurs de l'enzyme IDO ou d'autres chimiothérapies. On peut citer par exemple, le lenalidomide qui permet de diminuer l'activité suppressive des T reg et des MDSC (Chiossone et al., 2018) bien qu'un effet positif sur les NK n'ait pas été mis en évidence chez les patients atteint de myélome multiple (Besson et al., 2018).

En résumé, les cellules NK ont un fort potentiel anti-viral et anti-tumoral. Rétablir leurs fonctions apparaît donc comme une perspective de traitement prometteuse. Cependant, de nombreuses questions restent en suspens quant aux mécanismes moteurs conduisant à leur perte de fonction en contexte chronique. Mieux comprendre ces processus de dérégulation est donc indispensable pour le développement de thérapies efficaces. Ceci nous amène à l'objectif de mes travaux de thèse.



# DEUXIEME PARTIE : PARTIE EXPERIMENTALE

## 1- Objectifs et hypothèses du travail de thèse

De par leurs propriétés, les cellules NK constituent une ligne de défense essentielle pour l'organisme en cas d'infection ou de transformation tumorale. Cependant, comme nous venons de le décrire, en cas de stimulation chronique, une perte de fonction de ces cellules a pu être observée dans un large panel de pathologies et les mécanismes à l'origine de cet état d'anergie demeurent peu caractérisés.

**Le but de mes travaux de recherche était donc d'identifier les voies moléculaires conduisant à la désensibilisation des cellules NK.** Lors d'études précédentes, nous avons montré que le niveau de réactivité des cellules NK est dépendant du niveau d'activation basale de la kinase mTOR. Ceci a été mis en évidence grâce à l'utilisation d'un modèle génétique de tolérance des cellules NK : la lignée murine pour laquelle le gène B2m, codant la Beta-2-microglobuline, protéine nécessaire à l'expression de surface du CMH-I, a été invalidé (B2m KO). L'absence d'expression des molécules de CMH-I chez ces souris conduit à une perte de réactivité des cellules NK comme nous l'avons décrit plus haut. Cette perte de réactivité corrèle avec un niveau faible d'activation de la voie mTOR (Marçais et al., 2017). Sur cette base, nous avons émis l'hypothèse d'une altération de la voie mTOR en contexte pathologique provoquée par la stimulation chronique des cellules NK.

Mes travaux de thèse se sont articulés autour de trois aspects : 1- le développement d'un modèle tumoral murin sensible aux cellules NK et sa caractérisation, 2- l'étude des mécanismes impliqués dans la perte de fonction progressive des cellules NK dans ce modèle et enfin 3- l'étude des cellules NK circulantes (phénotype, fonction et niveau d'activation de la voie mTOR) d'une cohorte de patients infectés par le VHB (autre situation de stimulation chronique des cellules NK).

De manière plus détaillée, la première partie de mon projet a permis de mettre en place un **modèle tumoral murin** pour étudier la réponse anti-tumorale conduite par

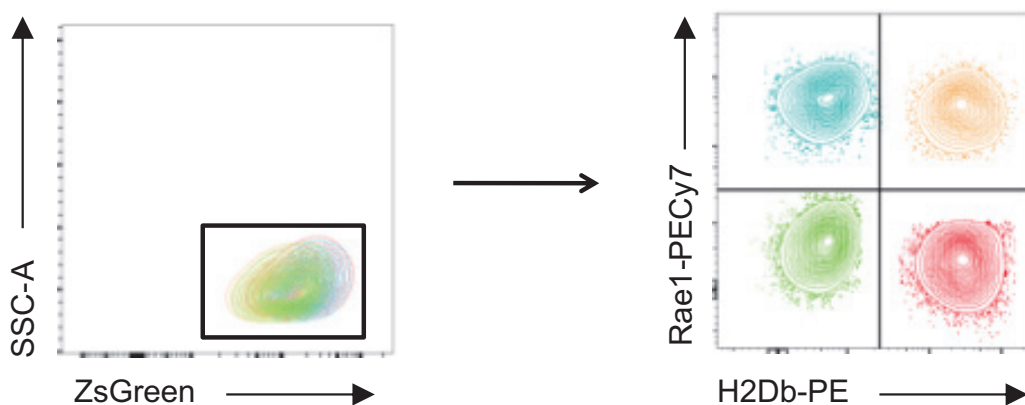
les cellules NK et de déterminer où, quand et comment les cellules NK contrôlent la tumeur. En effet, les modèles existants utilisés pour l'étude des cellules NK en contexte tumoral présentent de nombreuses faiblesses. La plupart des études ont été réalisées dans des modèles de tumeurs solides exprimant faiblement les molécules de CMH-I et injectées par voie sous-cutanée comme les lignées de lymphome RMA-S et A20, de carcinome de la prostate RM-1 ou de carcinome mammaire DA3. Les tumeurs ainsi générées sont très faiblement infiltrées par les cellules NK et le matériel disponible pour réaliser des tests de sortie est donc limité. De plus, d'autres modèles classiquement utilisés, comme les modèles utilisant les lignées de mélanome B16 par exemple, ne sont pas adéquats car ils stimulent faiblement les cellules NK.

Au cours de ce travail, nous avons modifié génétiquement la lignée de lymphome RMA afin de rendre les cellules immunogènes vis à vis des cellules NK. Le gène B2m a été invalidé par utilisation de la technologie CRISPR/Cas9 et nous avons introduit par transduction lentivirale l'expression ectopique du gène Rae1- $\beta$ , un ligand du NKaR NKG2D. Ainsi, nous disposons de quatre lignées : la lignée parentale RMA, la lignée RMA-KO déficiente pour B2m, la lignée Rae1- $\beta^+$  et la lignée RMA KO Rae1- $\beta^+$  (RMA-KR) (Figure 29). Cette dernière lignée (RMA-KR), est donc caractérisée par l'absence d'expression du CMH-I et la forte expression de Rae1- $\beta$ , elle est de ce fait fortement immunogène pour les cellules NK. De plus, nous avons introduit l'expression de la ZsGreen, une protéine fluorescente de spectres d'émission/absorption similaires à la GFP (Green fluorescence protein) dans la lignée parentale RMA et dans les trois autres lignées. En utilisant ce modèle de lymphome T, nous avons pu analyser les interactions entre les cellules tumorales et les cellules NK et proposer une base solide pour une meilleure compréhension du dialogue *in vivo*, et de la réponse anti-tumorale à la fois contre les tumeurs liquides et contre les métastases. Ici, les cellules sont injectées par voie-intraveineuse et établissent des tumeurs dans la rate où elles sont en contact avec un nombre important de cellules NK.

L'injection de ces cellules tumorales modifiées conduit à la stimulation chronique des cellules NK, et permet ainsi de générer de l'épuisement et d'en étudier les

caractéristiques. La deuxième partie de mes travaux de thèse a donc consisté en l'étude des mécanismes impliqués dans la perte de fonction des cellules NK. Nous avons utilisé deux approches : la première basée sur notre hypothèse concernant la dérégulation de la voie mTOR et l'impact sur le métabolisme, et la seconde, basée sur une approche non biaisée par analyse en RNA seq du profil transcriptionnel des cellules NK chroniquement exposées aux cibles RMA-KR.

Le fait que des populations de cellules NK dysfonctionnelles soient retrouvées dans différents types de maladies chroniques suggère que certains des mécanismes conduisant à leur désensibilisation pourraient être partagés. C'est pourquoi en parallèle, j'ai conduit une étude clinique visant à caractériser les cellules NK de patients chroniquement infectés par le virus de l'Hépatite B, au niveau phénotypique et fonctionnel, et à identifier les mécanismes conduisant à leur perte de fonction.



**Figure 29: Génération des 4 lignées**

A partir de la lignée parentale RMA (rouge), le gène B2m a été invalidé par CRISPR/Cas9 afin de générer la lignée RMA-KO (verte). Le gène Rae1- $\beta$  a ensuite été introduit par transduction d'un lentivirus contenant le gène codant pour Rae1- $\beta$ , dans la lignée RMA et dans la lignée RMA-KO permettant de créer les lignées RMA-Rae1- $\beta^+$  (orange) et RMA-KR (pour KO et Rae1- $\beta^+$ , apparaissant en bleu). Toutes les lignées ont été transduites par un lentivirus codant la protéine fluorescente ZsGreen détectable en cytométrie en flux.



## **2- Résultats**

### **2.1 Génération d'un modèle de lymphome fortement immunogène vis à vis des cellules NK**

Le premier article présente l'établissement du modèle de lymphome RMA-KR et l'immunosurveillance de cette tumeur par les cellules NK.

#### **État de l'art :**

- Les cellules NK ont un rôle dans l'immuno-surveillance des tumeurs
- Une perte de la fonctionnalité des cellules NK similaire à l'état d'épuisement décrit pour les LT a été observée dans des modèles murins tumoraux et chez des patients atteints de cancers solides, hématologiques et métastatiques
- L'absence de bon modèle ralentit la compréhension des mécanismes moléculaires de l'épuisement des cellules NK

#### **Principaux résultats :**

- Génération d'un nouveau modèle de lymphome établissant des tumeurs au niveau de différents organes (foie, poumon, cerveau, moelle osseuse, rate)
- Les cellules NK contrôlent la tumeur à différents stades, elles s'activent de manière précoce mais prolifèrent tardivement
- Le contrôle devient progressivement inefficace et la fonctionnalité des cellules NK s'effondre aux stades terminaux. Ce processus est dépendant de la charge tumorale.
- Les deux limitations principales de l'activité anti-tumorale semblent être la faible capacité à contrôler et à infiltrer les métastases au niveau d'organes tels que le foie et l'épuisement tardif qui survient au niveau de la rate

#### **Impacts :**

- Meilleure compréhension de l'immunosurveillance des tumeurs par les cellules NK : interactions/lieu/cinétique ainsi que des voies dérégulées au cours de l'épuisement des cellules NK
- La quantité de matériel disponible est importante et permet d'envisager des études « omiques » à grande échelle et à large spectre
- Utilisation possible de ce modèle pour tester de nouvelles cibles thérapeutiques visant à revigorer les cellules NK

## 2.1.1 Article 1

### **NK cell-mediated protection against hematologic tumors is limited by functional exhaustion, lack of expansion and poor infiltration of large metastases**

Marie Marotel<sup>1,2,3,4,5</sup> ,, Annabelle Drouillard<sup>1,2,3,4,5</sup> ,, Yamila Rocca<sup>1,2,3,4,5</sup> ,, Aurore Berton<sup>1,2,3,4,5</sup> ,,  
Marine Villard<sup>1,2,3,4,5</sup> ,, Anne-Laure Mathieu<sup>1,2,3,4,5</sup> ,, Michelle Ainouze<sup>1,2,3,4,5</sup> , Uzma Hasan<sup>1,2,3,4,5</sup> ,  
Thierry Walzer<sup>1,2,3,4,5,\*</sup> , and Antoine Marçais<sup>1,2,3,4,5,\*</sup> ,

1 CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie - International Center for Infectiology Research, Lyon, 69007 France.

2 Inserm, U1111, Lyon, France.

3 Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon, France.

4 Université Lyon 1, Lyon, France.

5 CNRS, UMR5308, Lyon, France

#### **Corresponding authors:**

Antoine Marçais and Thierry Walzer (orcid.org/0000-0002-0857-8179)

Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI), INSERM U1111 – CNRS UMR5308, Université Lyon 1, ENS de Lyon. 21 Avenue Tony Garnier - 69365 LYON cedex 07, France. Tel +33 (0)437 28 23 73. E-mails: [Antoine.marcais@inserm.fr](mailto:Antoine.marcais@inserm.fr); [thierry.walzer@inserm.fr](mailto:thierry.walzer@inserm.fr)

## **Abstract**

Natural Killer (NK) cells are classically presented as cytotoxic lymphocytes involved in cancer immunosurveillance at early stages and for tumors that lose MHC-I expression. However, there is in fact little information about how NK cells respond to tumors *in vivo*, where and when they do it, and which NK cell subsets are involved. To address these questions, we engineered a new mouse model of lymphoma strongly immunogenic for NK cells. We showed that when injected iv into mice, tumor cells disseminate in many organs, but are efficiently controlled for several weeks by NK cells in the spleen and in the blood circulation, in a perforin and IFN $\gamma$ -dependent manner. NK cells were rapidly activated upon tumor injection but only proliferated at late stages of tumor growth. This proliferation was independent of tumor immunogenicity and skewed the NK cell maturation profile, but it did not lead to increased numbers of NK cells and had little impact on the repertoire of NK cell receptors. Moreover, we found that the control of liver and lung tumors and to a lesser extent that of bone marrow and brain tumors was not as efficient as it is the blood circulation. This led to outgrowth of large metastases, poorly infiltrated by NK cells, and subsequent mouse death. Finally, we showed that NK cells become dysfunctional in the spleen at late stages of tumor growth, which coincided with tumor growth. NK cell dysfunction was very broad, affecting all cytokine and activating receptors pathways, and was independent of immune checkpoints. These data shed light on the quality of NK cells as effectors of cancer immunosurveillance and point to the limits of their activity.

## Introduction

Natural Killer (NK) cells are innate cytotoxic lymphocytes with an important role in anti-viral immune responses and in cancer immunosurveillance <sup>1</sup>. NK cells display several effector functions, including granule-dependent cytotoxicity, secretion of inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ ) and chemokines (CCL3-5) that are thought to have complementary roles during immune responses.

A role for NK cells in cancer immunosurveillance has been suggested early on in the late 1970's, based on the observations that many tumor cell lines were more or less susceptible to NK cell mediated killing *in vitro*. The identification of NK cell receptors and the elucidation of tumor recognition mechanisms established that NK cells were particularly well adapted to recognize and kill cancer cells *in vivo* <sup>2</sup>. NK cells recognition of target cells is finely regulated through a wide range of activating (NKG2D, DNAM-1, NKp30, NKp46 etc) and inhibitory (KIRs, NKG2A, CD96, TIGIT etc) receptors. Mice deficient in activating NK cell receptors NKG2D, NKp46 and DNAM1 are more susceptible to different types of transplanted or spontaneous tumors <sup>3-5</sup>. NK cell activation and effector functions are triggered when activating signals overcome inhibitory ones, the latter being provided by upon recognition of MHC-I molecules. Mechanistically, this involves opposing actions of kinases and phosphatases on common substrates <sup>6</sup>. Tumor cells may lose MHC-I expression as a result of genomic instability combined with CD8-T cell mediated editing <sup>7</sup> and MHC-I negative cells are often strongly susceptible to NK cell-mediated lysis <sup>8</sup>.

NK cell anti-tumor activity can be either direct via the recognition and elimination of tumors, or indirect, through the activation of other immune cell types by cytokine secretion. In other terms, NK cells can be endpoint effectors or rather auxiliary cells, and this depends on the level of MHC-I displayed by tumor cells and on their overall immunogenicity for NK cells. In the case of MHC-I negative tumors, NK cells are the only effector cells capable of killing cancer cells. However, in the case of MHC-I positive tumors, the role of NK cells could be rather to help priming T cell responses. For example, recent articles have documented the importance of the crosstalk between NK cells and dendritic cells (DC) in the initiation of the anti-tumor T cell response in the context of the response to immunotherapies <sup>9,10</sup>. However, as mentioned above, CD8 T cell responses often promote the outgrowth of MHC-I negative tumor clones that are resistant to CD8 T cells but that are theoretically susceptible to NK cell mediated recognition and elimination. With the advent of immunotherapies, such

MHC-I negative tumors may become much more frequent and it is therefore essential to better understand how NK cells respond against these tumors and how to improve their efficacy.

The MHC-I low RMA-S and A20 lymphoma lines or the RM-1 prostate carcinoma and DA3 mammary carcinoma cells have been previously used to study NK cell response, owing to their high immunogenicity for NK cells *in vitro* and *in vivo*. The cytotoxic function of NK cells appears mandatory to control RMA-S cells, as perforin deficient<sup>11</sup> or granzyme A/B deficient mice<sup>12</sup> cannot control them when they are injected ip. Moreover, upon iv injection, RM-1 and DA3 form lung metastases, which are controlled by NK cells in a perforin-dependent manner<sup>13</sup>. When injected sc, all these cell lines generate large, solid tumors and NK cell depletion prior to tumor injection typically leads to the acceleration of tumor growth. However, the parameters of NK cell response to these transplanted tumor lines remain poorly understood. In particular, the kinetics of NK cell response in relation with tumor growth remains undefined, and it is still unclear if NK cells are capable to mount strong and durable responses, involving proliferation. Moreover, the NK cell population is known to be highly heterogeneous with a broad repertoire of cells more or less mature, and expressing different NK cell receptor combinations. In the case of cytomegalovirus infections, clonal-like proliferation of NK cell subsets expressing the activating receptors Ly49H (mouse) or NKG2C (human) have been identified, but there is however very few information on which NK cells respond to tumor challenge *in vivo*.

Another important unresolved issue regards the regionalization of NK cell response, which experimentally depends on the route of tumor inoculation and on the tumor type. As recently reviewed,<sup>14</sup> NK cells play an essential role in the control of metastases. Tumors may become metastatic via a process called Epithelial-mesenchymal transition (EMT). In a recent study, it was found that EMT modified lung tumors in a way that increased their susceptibility to NK cell killing. Accordingly, NK cell depletion had much more impact on the number of metastases than on the growth of the primary tumor<sup>15</sup>. This observation suggests a variable loco-regional control of tumors by NK cells. Several factors may influence the efficiency of this control including the relative representation of NK cells in the different organs, the access of NK cells to the tumor bed, and the tumor phenotype. These questions are of outstanding interest for the design of optimal NK cell-based immunotherapies.

Additionally, even though NK cells have a strong anti-tumor potential, they become dysfunctional during cancer development in mouse models, but also in human <sup>16</sup>. An important and unresolved question is whether this dysfunction is the consequence or the cause of tumor growth *ie* do tumor cells need to escape NK cell recognition in order to grow or do NK cells become dysfunctional because they are overwhelmed by tumors. This question is tightly linked to that of NK cell immunotherapy, because if tumor growth occurs at least in part as a result of NK cell dysfunction, reinvigorating dysfunctional NK cells should therefore lead to tumor regression.

To address these different questions, we have developed a novel mouse model of lymphoma that we engineered to be highly immunogenic for NK cells *in vitro* and *in vivo*. In this model, we monitored tumor growth in different organs and in mice that were depleted or not of NK cells at different time points. Moreover, we assessed NK cell immunosurveillance of the tumor in terms of activation markers, maturation, proliferation, repertoire of NK cell receptors and responsiveness to cytokines or through activating receptors. Our results show that i) NK cells displayed a very strong anti-tumor activity *in vivo* that persisted for several days after tumor injection; ii) that the tumor control was locally deficient in the lung and liver, leading to metastases poorly infiltrated by NK cells; iii) that NK cells proliferated at late stages of tumor growth, independently of tumor immunogenicity but this did not lead to NK cell expansion; iv) that NK cells became largely dysfunctional at late stages of tumor growth, which could favour tumor growth. These data shed light on the quality of NK cells as effectors of cancer immunosurveillance and point to the limits of their activity.

## Results

### A novel model of metastatic NK cell-sensitive hematologic tumor

We sought to study NK cell anti-tumor activity *in vivo* in the context of a strongly immunogenic tumor. To this aim, we first modified the RMA lymphoma cell line (C57BL/6 background) using Crispr/Cas9 mediated genome editing to knock out *B2m* expression. This resulted in a cell line devoid of H2Db and B2M expression (Figure 1A and Figure S1A). Next, *B2m* deficient and *B2m* sufficient RMA cells were transduced with a lentivirus expressing both ZsGreen protein and the strong NKG2D ligand Rae1- $\beta$  (Figure 1A and Figure S1A). All cell lines were then cloned to ensure homogeneity. As expected, *B2m*<sup>-/-</sup> RMA cells expressing Rae1- $\beta$  (thereafter called RMA-KR for RMA-KO-*B2m* Rae1- $\beta$ <sup>+</sup>) were very susceptible to NK cell mediated killing (Figure 1B) and NK cells produced high levels of IFN- $\gamma$  in the presence of these cells (Figure 1C). RMA cells bearing only one of both modifications (RMA- *B2m*-KO or RMA-Rae1- $\beta$ <sup>+</sup>) displayed intermediate immunogenicity between parental RMA and RMA-KR cells.

We then injected RMA or RMA-KR cells intravenously in the tail vein of C57BL/6 mice, at different doses ranging from  $5 \times 10^5$  to  $5 \times 10^7$ , and monitored mouse survival. As previously shown<sup>17</sup>, RMA cells are very aggressive *in vivo* and the injection of these cells led to a rapid death of injected animals, irrespective of the number of tumors injected (Figure 1D). By contrast, mice injected with RMA-KR cells survived much longer, and this survival was inversely proportional to the number of tumor cells injected (Figure 1D). Given the immunogenicity of RMA-KR cells *in vitro*, we suspected that NK cells would mediate a strong protection against this tumor. Indeed, when we depleted NK cells by means of NK1.1 antibody injection, there was no longer a difference in survival between RMA and RMA-KR-injected animals (Figure 1E). Of note, NK cell depletion had no impact on the survival of RMA-injected mice (Figure 1E), while T cell depletion did not influence mouse survival in any of the two models (Figure S1B).

Thus, RMA-KR cells are strongly immunogenic for NK cells *in vitro* and *in vivo* and transplantation of RMA-KR cells appears as an appropriate model to study NK cell anti-tumor activity *in vivo*. In all subsequent experiments,  $5 \times 10^6$  tumor cells were injected when we monitored mouse survival, and  $5 \times 10^7$  cells were injected when we analyzed NK cell-tumor cell interplay.

### **NK cell control RMA-KR cells for prolonged periods, via perforin and IFN- $\gamma$**

Next, we wanted to determine how, when, and where NK cells controlled RMA-KR cells *in vivo*. These questions were only partially addressed in other models and the information available was often based on indirect evidence. We first asked what NK cell effector functions were required for the control of RMA-KR cells *in vivo*. To address this question, we injected RMA-KR cells into Prf1<sup>-/-</sup> mice or control mice that were treated with blocking anti-IFN- $\gamma$  antibody or vehicle, and monitored survival in the different mouse groups. As shown in Figure 2A, both Perforin and IFN- $\gamma$  were important for the control of RMA-KR cells, and the blockade of both cytotoxicity and IFN- $\gamma$  activity abrogated the protection mediated by NK cells, as shown by the near superposition of survival curves of C57BL/6 mice depleted of NK cells and Prf1<sup>-/-</sup> mice that received anti-IFN- $\gamma$  antibody. Thus, both cytotoxicity and IFN- $\gamma$  are essential for NK cell control of RMA-KR cells *in vivo*.

We then investigated the timing of NK cell control. To this aim, we depleted NK cells at different time points after tumor injection in recipient mice, from day -1 up to day 9 (see protocol Figure 2B) and monitored mouse survival. As shown in Figure 2C, we observed that NK cell depletion compromised mouse survival, especially when NK cells were depleted at day -1, showing that NK cell control of tumors occurred mainly at early stages. Yet, the effect of NK cell depletion on mouse survival remained significant until day 6.

### **NK cells limit tumor growth in the spleen**

Next, we analyzed RMA and RMA-KR tumor growth in different organs. For this, we took advantage of ZsGreen expression by RMA and RMA-KR cells, which allowed precise monitoring of tumor growth in different organs by flow cytometry of single cell suspensions prepared from these organs (Figure S2). We first analyzed the growth of RMA or RMA-KR cells in the spleen (Figure 3A). Immediately after injection (day 1-3) the number of RMA cells dropped, likely reflecting the limited grafting capacity of both cell lines. After this initial phase, they started proliferating in an exponential manner, until day 9 and mouse death. By contrast, and in agreement with results in Figure 1-2, tumor growth was very much delayed in the RMA-KR model as it started days 9-11 depending on the experiments. Three phases of RMA-KR growth could be delineated: an initial phase where most tumors were eliminated, a second, intermediate phase where the number of tumor cells was kept under control, presumably by NK cells, and a late phase where the tumor started growing again. These



three phases are clearly reminiscent of the three “E” of cancer immunity<sup>19</sup>. However, the late “escape” phase was likely not due to tumor editing in our model as the expression of B2M and Rae1- $\beta$  by RMA-KR cells was similar at early and late time points of tumor growth (Figure S3). In some experiments, we also monitored tumor growth in different organs. Results presented in Figure 3B showed that tumor cells started growing at early time points in the lung and liver, at intermediate time points for bone marrow and brain, but at late time points for LN, spleen and blood. This discrepancy suggested a variable control of tumor cells by NK cells, this control being more efficient in the spleen and blood than in other organs. Altogether these results show that NK cells operate a prolonged control of RMA-KR cells *in vivo* that is more efficient in the spleen than in other organs, but is eventually not sufficient to prevent tumor growth.

### **RMA-KR cells form big metastases poorly infiltrated by NK cells at late stages in the liver and lung**

We wanted to understand why RMA-KR cells were growing more rapidly in the liver and lung than in the spleen. A visual inspection of these organs at late stages of tumor growth indicated the presence of large metastases in the liver, but not in the spleen, especially when  $5 \times 10^6$  RMA-KR cells were injected (Figure 4A). This suggested that NK cells control of RMA-KR tumor cells was not completely efficient in the liver, and this led to the outgrowth of metastases derived from a limited number of precursors. To compare NK cell control in the liver vs spleen, we repeated NK cell depletions at several time points before and after tumor injection, and monitored tumor growth in the spleen and in the liver ten days after tumor injection. As presented in Figure 4B, three days were sufficient to clear almost every tumor cells in the spleen. A small number of tumor cells did however persist in this organ, but did not grow in the time period analyzed. In the liver, the situation was very different than in the spleen, *ie* the initial control of tumor cells by NK cells was not as efficient as in the spleen, but this control was persistent over the 10 day-period analyzed.

A potential explanation for the discrepancy between spleen and liver was a different probability of interaction between NK cells and tumor cells depending on the organ analyzed. In an attempt to address this question, we estimated the volume of each organ analyzed and calculated the number of NK cells per volume unit in each organ. This number was clearly decreased in the liver compared to the spleen (Figure 4C). This rough estimation supports

the possibility that the poor control of RMA-KR cells in the liver is linked to a decreased likelihood of interaction.

To understand why NK cells did not control those metastases once they formed, we dissected them from the healthy liver tissue and analyzed NK cell infiltration. As shown in Figure 4D, the percentage of immune cells infiltrating liver metastases was quite low, and the percentage of NK cells in these immune infiltrates was also very low. This resulted in a very low NK-to-tumor ratio that was likely inefficient at controlling tumor growth.

Thus, a limited control of RMA-KR cells by NK cells in the liver at early stages of tumor growth led to the formation of large metastases poorly infiltrated by NK cells at later cancer stages.

### **NK cells are activated and proliferate in response to tumor growth but the NK cell repertoire remains unchanged**

Next, we monitored NK cell phenotype during their response to the tumor in the spleen. We compared the NK cell response to RMA vs RMA-KR cells, to discriminate between bystander effects due to tumor growth (RMA) from direct activation of NK cells by tumor cells (RMA-KR).

We first examined the expression of NK cell activation markers CD69 and Ki67. Results were expressed as the percentage of NK cells positive for each marker over time (Figure 5A) or according to the percentage of tumors in the spleen (Figure 5B), so as to overlay results with RMA and RMA-KR cells with the same scale. NK cells were activated in the course of tumor growth in both RMA and RMA-KR models, as demonstrated by coordinated up regulation of CD69 and Ki67 (Figure 5B). In both models, NK cell activation was also proportional to tumor load in the spleen. Yet, signs of NK cell activation were detected with lower percentages of tumor in the RMA-KR model compared to the RMA model (Figure 5B), suggesting that tumor immunogenicity contributed to NK cell activation, even though the main driver of this activation was the tumor load. CD69 positive NK cells were mainly immature NK cells with a CD11b<sup>-</sup> CD27<sup>+</sup> phenotype (Figure 5C).

Next, we monitored NK cell proliferation during tumor growth. This was achieved by transferring CTV-labelled NK cells from donor Ly5a mice into C57BL/6 mice that were then injected with tumors. As shown in Figure 5D, we detected NK cell proliferation in both models, but this proliferation was only apparent at late stages of tumor growth (day 9 for

RMA, days 12-13 for RMA-KR), well after NK cells started controlling the tumor, thus excluding that NK cell anti-tumor activity was dependent on proliferation. NK cell proliferation was restricted to immature NK cells defined by low CD11b and high CD27 expression (Figure 5E). Consequently, we observed a relative increase in immature NK cells (Figure 5F), which was associated to a global increase in spleen cellularity, evocative of tumor-induced inflammation (Figure 5G). However, this proliferation did not lead to increased numbers of NK cells as the total number of NK cells, especially of mature phenotype rather dropped during tumor progression in the RMA-KR model (Figure 5H).

We then asked if the repertoire of NK cell subsets was modulated during the course of tumor growth, as is the case with some viral infections. To address this point, we applied a flow cytometry panel allowing the measurement of twelve NK cell receptors, many of which with variegated expression to evaluate NK cell repertoire during tumor growth (Figure S4A). A boolean gating analysis of NK cells according to the expression of these receptors predicted the existence of about 4000 NK cell subsets with various combinations of the receptors. However, many of the theoretical populations were very small, and therefore negligible. To reduce the complexity of the results and yet keep track of possible changes in repertoire, we used unsupervised analysis of FACS data using Phenograph, and gated on both immature and mature NK cells to take changes in maturation into account. This analysis did not reveal major changes in repertoire (Figure S5B), even though slight changes were observed in underrepresented populations (Figure S5B and data not shown).

Altogether, these results showed that NK cells expressed activation markers and proliferated in both RMA and RMA-KR models at late stages of tumor growth, which impacted overall maturation but not the repertoire of NK cell receptors. These observations show that NK cell proliferation *in vivo* is not induced upon direct recognition of tumor cells by NK cells, but rather the result of indirect activation, perhaps by cytokines expressed during tumor growth by other immune cells.

### **NK cell exhaustion is associated with exponential tumor growth in the spleen**

Next, we wanted to determine how tumor growth in the RMA-KR model correlated with NK cell function. To test this point, we measured the *ex vivo* responsiveness of spleen NK cells from tumor bearing animals at different stages upon stimulation with crosslinking NK1.1 antibodies. Degranulation and IFN- $\gamma$  secretion were measured, and we displayed the percentage of NK cells positive for both markers as a function of the number of tumor cells in the spleen. Results in Figure 6A showed a gradual weakening of the NK cell response in the RMA-KR model but not in the RMA model upon tumor growth. We expressed the same results as a function of the calculated NK-to-tumor ratio, and this showed that NK cell response dropped as soon as this ratio dropped below 1 (Figure 6B). These results were not only true for NK1.1 stimulation, because we observed a similar NK cell dysfunction upon stimulation with a variety of stimuli including antibody-mediated crosslinking of activating receptors NKG2D or NKp46, tumor cells RMA-KO, cytokines IL-15, IL-12 and IL-18, and even to some extent PMA/ionomycin (Figure 6C and Figure S5). These results strongly suggested that similar to T cells, NK cells undergo functional exhaustion in the course of anti-tumor responses, as a result of prolonged stimulation through NK cell receptors. This exhaustion was also associated with the up regulation of so-called “immune checkpoints” Tim3 and Tigit on a fraction of spleen NK cells (Figure 6D and Figure S6), further showing the connection between T cell and NK cell exhaustion in tumoral contexts. Moreover, dysfunctional NK cells had a poor response to stimulation through NK1.1 or IL-15 in terms of phosphorylation of signaling molecules (Figure 6E), showing that NK cell exhaustion was due to the uncoupling of activating receptors with the signaling machinery.

## Discussion

The immune system plays a critical role in cancer patients' clinical outcome and response to conventional chemotherapy. Promising results obtained by mAbs targeting inhibitory receptors CTLA-4 and PD-1 in metastatic cancer demonstrate that strategies that aim to restore immune reactivity against cancer represent a valid therapeutic option<sup>20</sup>. Yet, resistance mechanisms have emerged, such as loss of B2M by cancer cells, which prevents MHC-I expression and antigen presentation to T cells<sup>21</sup>. As T cells are the primary targets of PD-1/PD-L1 antibodies and other immune checkpoint (ICP)-blockers (ICB), loss of antigen presentation explains the resistance to these treatments. However, loss of MHC-I expression is a situation specifically recognized by NK cells, and it is therefore important to understand how NK cells respond to MHC-I deficient tumors *in vivo* so as to be able to manipulate their activity for the benefit of patients. Here, we set up a novel model of NK-cell sensitive lymphoma by modifying the well-known RMA line. Of note, we did not use the RMA-S model, which is TAP2 deficient, because these cells expressed low but significantly higher levels of MHC-I molecules compared to the RMA-KR cells that are MHC-I negative. The expression of Rae1- $\beta$  made these cells even more immunogenic for NK cells as demonstrated by cytotoxicity assays. We dissected the parameters of cancer immunosurveillance by NK cells in the RMA-KR model.

We found that both perforin and IFN- $\gamma$  were essential for NK cell mediated protection. Perforin is obviously involved in NK cell mediated cytotoxicity of MHC-I deficient cells, as previously shown *in vivo*<sup>11,13</sup>. We haven't tested the role of Trail/FasL in target cell elimination *in vivo* but this pathway could be also involved, as suggested by a recent study showing that serial killing by NK cells involved both perforin and Trail/FasL pathways, both pathways acting in a consecutive manner<sup>22</sup>. How IFN- $\gamma$  mediates protection is unclear; there could be direct negative effects on tumor proliferation upon engagement of IFNGR<sup>23</sup>, and indirect effects potentiating NK cell cytotoxicity, perhaps through the activation of monocyte or other myeloid cells, and the chemo-attraction of distant NK cells at the tumor site<sup>24</sup>.

In our tumor model, NK cells eliminated most tumor cells during the first three days following intravenous injection. This suggests a very high killing rate during this period, which is consistent with previous live imaging studies showing a very dynamic behavior of NK cells within tumors<sup>25</sup>. NK cells were indeed found to engage very short interactions with tumor cells that were however sufficient to kill them<sup>26</sup>. NK cell killing activity was found to

be more efficient in the spleen than in other compartments such as the liver. As the liver is a large organ, a potential explanation for such discrepancy could be merely the likelihood of interaction between tumor cells and NK cells. Yet, liver NK cells displayed a prolonged anti-tumor activity in our model, which constitutes the first demonstration of a sustained role of NK cells in cancer immunosurveillance, as opposed to previous models, such as the B16 where the role of NK cells was found to be very transient <sup>18</sup>.

Our observations also suggest that NK cell anti-tumor activity is much more efficient in the first days following tumor injection, *ie* when tumor cells may be still in circulation, than later in the response, in particular when large metastases form. The same observation has been made for CAR T cells, that are much more efficient at targeting “liquid” tumors than solid ones in part because of their inability to extravasate in the tumor bed <sup>27</sup>. Similarly, in the B16 model, NK cells produce low amounts of IFN- $\gamma$  within the 4 hours that follow B16 injection and this weak activity is sufficient to prevent implantation of those cells in the lung and metastasis outgrowth <sup>18</sup>. Thus, NK cells appear specialized in the control of metastatic precursors in the blood circulation. More studies will be needed to visualize the interaction between NK cells and circulating tumor cells, and understand the mechanisms involved in this interaction. However, once metastases are formed, NK cells are inefficient at controlling them. This could be due to a poor capacity of NK cells to infiltrate metastases, but also a limited capacity of NK cells to thrive in the metastatic environment where many immunosuppressive mechanisms could be at play. In particular, NK cells appear to have a weak metabolic activity compared to T cells, in terms of glycolysis and oxidative phosphorylation, even after stimulation with IL-15 <sup>28</sup>. Thus, NK cells may not be optimally equipped to compete with cancer cells for a limited supply of metabolites within the tumor bed.

For the first time, we show that NK cells naturally proliferate during tumor progression. However, this proliferation was independent of tumor immunogenicity and proportional to tumor load and increase in spleen cellularity. Moreover, it did not lead to NK cell expansion and it did not change the overall structure of the NK cell repertoire, suggesting that it was induced in a bystander manner, upon inflammation caused by tumor growth. The best cytokine candidate for the induction of this proliferation was IL-15, given the known role of this cytokine in NK cell biology; yet we failed to detect increased levels of soluble IL-15 in the spleen (unpublished data). An increased exposure of IL-15 / IL-15Ra

complexes on the membrane surface of myeloid cells such as dendritic cells, is however conceivable considering the biology of this unusual cytokine<sup>29</sup>. IL-15 produced by dendritic cells is known to prime NK cell responses, downstream of type I IFN, in mice treated with Toll like receptors agonists or upon viral infection<sup>30</sup>. A recent study showed the importance of the C-GAS-STING pathway for NK cell mediated rejection of RMA-S cells<sup>31</sup>. Constitutive C-GAS expression in tumor cells was found to be essential for STING activation in host cells, and subsequent type I IFN production. Whether STING is required in our tumor model is an open question, but it should be emphasized that the observed NK cell proliferation was independent of the anti-tumor activity as it occurred much later than the initial control of the tumor load, and was observed in both RMA and RMA-KR models, despite the ignorance of RMA cells by NK cells *in vitro* and *in vivo*.

As previously found by others<sup>32-34</sup>, our results show a progressive dysfunction of NK cells during tumor progression in mouse. Similar to previous studies using RMA-S cells or other MHC-I deficient lines<sup>32,33</sup>, we found that NK cell dysfunction only occurred in the context of immunogenic tumors *ie* RMA-KR. However, it should be emphasized that our study is the first one showing that NK cell dysfunction correlates with tumor growth and is not the consequence of it. Indeed, in previous articles, NK cell function was only assessed in large and rapidly growing subcutaneous tumors, where, by definition, immunosurveillance was lost. In the RMA-KR model, NK cell dysfunction occurred precisely at the time of tumor growth, suggesting that the loss of NK cell activity was a contributing factor of tumor growth. This suggests that the RMA-KR model is particularly suitable to test novel immunotherapies aiming at boosting or reinvigorating NK cell function. Moreover, the RMA-KR model allows the generation of large numbers of dysfunctional NK cells, which should facilitate the elucidation of the underlying mechanisms of dysfunction.

Finally, the RMA-KR model represents a simple and versatile model to study NK cell function in knockout mice of different backgrounds. This model is certainly more appropriate than the widely used B16 model, since RMA-KR cells, unlike B16 cells, are strongly immunogenic for NK cells both *in vitro* and *in vivo*.

## Material and Methods

### *Mice and in vivo procedures*

All experimental procedures were approved by the bioethic local committee CECCAPP according to the French recommendations in the Guide for ethical evaluation of experiments using laboratory animals and the European guidelines 86/609/CEE. Wild-type C57BL/6 mice were purchased from Charles River Laboratories (L'Arbresle). Ly5a heterozygotes mice and Prf1 <sup>-/-</sup> were bred in our animal house. Female mice 7 to 9 week old were used unless specified.

For i.v injection, tumor cells were resuspended in 150 µL HBSS (Gibco) and 5x10<sup>5</sup>, 5x10<sup>6</sup> or 5x10<sup>7</sup> cells were injected in the tail vein. For depletion experiments, monoclonal antibodies were purchased from Bioxcell.

To deplete NK cells, mice were injected i.p with 200 µg PK136 on day -1 or on days 3, 6 and 9 relative to tumoral cell injection. To deplete T cells, mice were injected i.p with 100 µg 53.5.8 clone (specific for CD8β+ T cells) and 100 µg GK1.5 (specific for CD4+ T cells) on day -1 and every five days then. A control group in which mice were injected i.p with 200 µg polyclonal anti rat IgG on day -1 was also included in the experiment. Specific depletions were confirmed by cells staining with antibodies different from the ones used for depleting cells. To block IFN-γ, mice were injected i.p with 200 µg XMG1.2 on day -1.

### *Cell culture*

All cell lines were cultured in RPMI 1640 medium (Invitrogen Life Technologies) supplemented with 10% of FCS, 2mM L-glutamine, 10 mM of penicillin/ streptomycin (HCL Technologies), 1 mM sodium pyruvate (PAA Laboratories), 20 mM Hepes (Gibco) and Non essential amino acids (Gibco). Cell cultures were maintained at 37°C in an incubator with humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>/95% air and used for *in vivo* injection after three subcultures.

### *Generation of MHC class I deficient and/or Rae1β expressing RMA*

Single guide (sg) RNAs targeting the first exon of the mouse *B2m* gene (sequence: AGTCGTCAGCATGGCTCGCT) was cloned into PX458 plasmid which also contain the Cas9 gene. Then 0.2x10<sup>6</sup> parental RMA cells were transfected by electroporation using Neon



transfection system (Thermo Fisher) with 1 pulse during 50 ms and at 1080V. Transfection efficiency was analyzed by GFP expression twenty-four hours after transfection. Cells were harvested and sorted for GFP expression forty-eight hours after transfection with a FACS Aria II instrument. Rae1 $\beta$  gene was subcloned from Origene plasmid MR220341 into the pRRLSIN-MND-IRES2-ZsGreen-WPRE lentiviral vector (p297). After amplification, RMA or MHC Class I deficient RMA cells were transduced with the empty p297 lentivirus or containing Rae1 $\beta$  and incubated during 24 hours with 50 MOI. Forty eight hours after cell transduction, cells were sorted on the expression of ZsGreen and subcloned.

### ***Flow cytometry analysis***

1.5x10<sup>6</sup> cells or 1x10<sup>6</sup> enriched NK cells (repertoire analysis) were immunostained during 30 min at 4°C with the appropriate monoclonal antibodies detailed in Table S1 purchased from Biologend, BD Biosciences, eBiosciences, Miltenyi or Cell Signaling Technology. Intracellular staining of Ki67 marker was performed with Foxp3 Fixation/Permeabilization Concentrate and Diluent (eBioscience). Intracellular staining of cytokines was performed with Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences). Intracellular staining of phosphorylated proteins was performed with Lyse/Fix and Perm III buffers (BD Biosciences). Phosphorylated proteins were stained during 40 minutes at RT. Flow cytometric analysis was performed on FACS Fortessa (Becton-Dickinson). Fluorescence Minus One controls were used to set the gates and data were analyzed with FlowJo 10.5.0 software (Tree Star).

### ***In vitro stimulation***

For degranulation assay, splenocytes or purified NK cells were stimulated during four hours with antibody coated plate using anti NK1.1 (PK136 from BioXcell), anti NKG2D (Mi-6 from eBiosciences), anti Ly49D (4E5 from BD Biosciences), or anti NKp46 (29A1.4 from Innate Pharma) at indicated concentrations in 2HB Immulon plate, or with PMA (10 ng/mL) and ionomycin (1  $\mu$ g/mL) or with recombinant mouse IL-12 at 25 ng/mL and IL-18 at 5 ng/mL or recombinant mouse IL-15 at 100 ng/mL, or cocultured with different target cell lines at a 1:1 ratio in presence of Golgi Stop (BD Biosciences) and anti-CD107a. The percentage of NK cells positive for CD107a and IFN- $\gamma$  was then analysed by flow cytometry.

For phospho-flow analysis, 3x10<sup>6</sup> splenocytes were stimulated using antibody coated plate

using anti NK1.1 (PK136, 40 µg/ml) or stimulated with IL-15 at 100 ng/mL during 30 minutes before fixation with 100 µL Lyse/Fix. Then cells were permeabilized with Perm III buffer and stained.

#### ***NK cell enrichment and in vitro cytotoxic assay***

NK cells were first enriched by negative depletion prior to killing assay. Briefly, splenocytes suspension were incubated with biotinylated mAb against: CD3 (14–2 C11), TCRb (H57-597), TCRgd (GL3), CD19 (ebio1D3), TER-119 (ter119) (eBiosciences), followed by incubation with anti-biotin microbeads (Miltenyi), and enrichment by magnetic separation on an AutoMACS. Enriched NK cells were then cocultured for 4 hours with different cell lines labeled with CTV (Life Technologies) at different Effector to target (E/T) ratios calculated based on the cell number and the percentage of NK cells after purification. The percentage of dead cells within CTV positive target cells was measured by flow cytometry after staining with 7AAD.

#### ***Repertoire analysis***

Repertoire analysis was performed by the *PhenoGraph* algorithm which is a clustering method that allows to identify phenotypically distinct communities in high-parameter single-cell data. It has been used as a plugin for *FlowJo10.6* program (BD) after prior installation on R version 3.5.1 obtained from the official *R-project* web site. First, we adjusted the same number of events in the NK cell population manually gated for all time and treatment condition samples by the “DownSample” plugin on *FlowJo*. Then concatenated the resulting samples and run the *PhenoGraph* algorithm based on 12 NK cell receptors of interest and plotted the clusters on dimensional reduction *t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding* (tSNE) visualization. Tim-3 as well as CD11b and CD27 maturation-related markers were excluded from the analysis.

We then pursued cluster characterization by size and phenotype when separating analyzed samples and assayed statistical differences on *GraphPad Prism Version 8.2.0*. between experimental conditions.

#### ***Assessment of NK cell proliferation***

NK cells from Ly5a heterozygotes mice were first enriched by negative depletion using AutoMACS. Then, NK cells were stained with 2 µM Cell Trace Violet (Thermo Fischer) during

15 min at 37°C. The percentage of NK cells was calculated and  $0.4 \times 10^6$  NK cells were injected in the ophthalmic venous sinus. Mice were sacrificed at different time points (D2, D6, D9 and D13) and splenic and liver NK cells were enriched by negative depletion. Proliferation was then monitored by measurement of CTV fluorescence using flow cytometry.

### Figure legends

#### **Figure 1: RMA-KR cells are strongly immunogenic for NK cells *in vitro* and *in vivo***

Phenotyping of RMA and modified RMA by flow cytometry for the expression MHC class I (H2D-b) or Rae1 $\beta$  (A). All generated cell lines are ZsGreen+. Cytotoxicity (B) of NK cells against different RMA cell lines and NK functionality (C) read out by CD107a expression and IFN- $\gamma$  production capacity after NK1.1 stimulation (10  $\mu$ g/mL) and IL-15 stimulation (100 ng/mL) were tested *in vitro* and analysed by flow cytometry.  $5 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^6$  or  $5 \times 10^7$  RMA or RMA-KR were injected i.v and mice survival was followed during 60 days (D).  $5 \times 10^6$  RMA or RMA-KR were injected i.v in NK replete mice or NK depleted mice and mice survival was followed (E). The experiments included at least 5 mice per group and were performed at least 2 times with similar results.

#### **Figure 2: NK cells control RMA-KR in a regional-dependent, perforin-dependent and IFN $\gamma$ -dependent manner**

$5 \times 10^6$  RMA-KR were injected i.v into Perf1  $-/-$  mice, control mice treated with anti-IFN- $\gamma$ , Perf1  $-/-$  mice treated with anti-IFN $\gamma$ , or into vehicle injected control mice and the overall survival was followed and Kaplan-Meier analyses are presented (left) and were analysed according to the log-rank (Mantel-Cox) test (right) (A). NK cells were depleted by means of anti NK1.1 injections at different time points (B) (D-1, D3, D6 or D9) and Kaplan-Meier analyses of mice survival are presented for each group (C) and were analysed according to the log-rank (Mantel-Cox) test.

The experiments included at least 5 mice per group and were performed at least 2 times with similar results. \*\*:p<0,005, n.s: non significant.

**Figure 3: NK cells control RMA-KR cells more efficiently in the spleen than in other organs**

$5 \times 10^7$  RMA or RMA-KR were injected i.v and mice were sacrificed at different time points (6h, D1, D2, D3, D4, D6, D7, D8, D9, D11, D12 and D13). The percentage of tumor cells in spleen was assessed by measurement of ZsGreen<sup>+</sup> cells (A). The data are representative of 6 independent experiments including at least 3 mice per group. The percentage of ZsGreen<sup>+</sup> cells in the spleen was also analysed in other organs at D1, D3, D6, D9 and D13. The number of tumoral cells in these different organs is indicated (B). The data are representative of 2 independent experiments including at least 3 mice per group.

**Figure 4: RMA-KR form NK cell-resistant metastases in the liver**

$5 \times 10^6$  or  $5 \times 10^7$  RMA or RMA-KR were injected i.v and mice were sacrificed at day D13 for the high dose ( $5 \times 10^7$ ) or D21 for the low dose ( $5 \times 10^6$ ). Pictures of livers at these late stages were taken and compared with healthy organs (A).  $5 \times 10^7$  RMA or RMA-KR were injected i.v into C57BL/6 mice or into NK depleted mice at different time points (D-1, D+1, D+3, D+6 and D+8) and mice were sacrificed at D10. The percentage of tumor cells in spleen and liver was assessed by measurement of ZsGreen<sup>+</sup> cells in each organ (B). Spleen and liver were collected and the volume of each organ was measured at early time points (D+1) after tumoral injections. Cell suspensions were then analysed by flow cytometry and the number of NK cells per volume unit was calculated for each organ in the different models (C). The percentage of CD45<sup>+</sup> cells and NK cells within the immune infiltrate of liver metastases as well as the percentage of ZsGreen<sup>+</sup> tumoral cells was measured by flow cytometry and is indicated in the bar graph (D). The experiments included at least 3 mice per group and were performed at least 2 times with similar results.

**Figure 5: Early activation but late proliferation of spleen NK cells in the RMA-KR model**

$5 \times 10^7$  RMA or RMA-KR were injected i.v and mice were sacrificed at different time points (D2, D4, D7, D8, D9, D11, D13, D14). The percentage of CD69<sup>+</sup> and Ki67<sup>+</sup> splenic NK cells was measured by cytometry and presented over time (A) and over tumor percentage (B). CD69<sup>+</sup> NK cells was also analysed in immature and in mature NK cells (C). NK cells from Ly5a mice were enriched by negative depletion, stained with CTV and transferred into C57BL/6 wild type mice.  $5 \times 10^7$  RMA or RMA-KR were then injected i.v and mice were sacrificed at D2, D6, D9 and D13 to monitor NK cell proliferation in the spleen by flow cytometry (D). Proliferation

was also analysed in relation with maturation (CD27 staining, left and CD11b staining, right) (e).  $5 \times 10^7$  RMA or RMA-KR were injected i.v and mice were sacrificed at different time points (D2, D4, D7, D8, D9, D11, D13, D14) and spleens were collected. The percentage of immature ( $CD11b^{low}$ ) vs mature ( $CD27^{low}$ ) NK cells was analysed by flow cytometry and represented in relation with the percentage of tumoral cells in the spleen (F). The experiments included at least 3 mice per group and were performed at least 2 times. Total number of splenocytes at these different time points is indicated in the bar graph for the RMA and RMA KR models (G). Total number of splenocytes in the RMA vs RMA KR models in the different time points (H).  $*=p<0,05$   $**** = p<0,0001$ .

**Figure 6: NK cells become functionally exhausted at late stages in the RMA-KR model, and the tumor load is a major driver of exhaustion**

At D8/D9 for RMA injections ( $5 \times 10^7$ ) or D12/13/14 for RMA-KR injections ( $5 \times 10^7$ ), NK cell functionality before and after stimulation during 4 hours with anti NK1.1 was analysed by flow cytometry. Data are represented in relation with the number of tumoral cells in the spleen (A) or in relation with the effector/target ratio (B). The experiments included at least 3 mice per group and were performed 5 times. The percentage of  $IFN-\gamma^+$  NK cells was also tested in response to various stimuli (plate bound anti NK1.1 used at different concentrations, anti NKG2D, anti Ly49D, anti NKp46, IL-12/18 and IL-15 cytokines and PMA/ionomycine or upon coculture with RMA KO at a ratio 1:1 after 4 hours) (C). The percentages  $Tim-3^+$ ,  $PD-1^+$ ,  $Lag-3^+$  and  $TIGIT^+$  NK cells were analysed by flow cytometry and represented over time (D). At D8/D9 for RMA injections or D12/13/14 for RMA-KR injections, spleens were collected and splenocytes were cultured for 30 minutes on plate bound NK1.1 (40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) or with IL-15 at 100  $\text{ng}/\text{mL}$ . Cells were subsequently stained and the averages MFI ( $\pm$  s.d) of intracellular pS6, pAkt, pSTAT5 and pErk in NK cells were analysed by flow cytometry (E). Fold changes between unstimulated condition and anti NK1.1 or IL-15 stimulation are shown. Statistical analyses were performed with the 2-tailed unpaired Student's t test. The experiments included at least 3 mice and were performed at least 2 times.  $**=p<0,005$   $**** = p<0,0001$ , n.s: non significant.

## Supplementary figure legends

### Figure S1: RMA-KR model characterization

Phenotyping of RMA and modified RMA by flow cytometry for the expression B2m or Rae1 $\beta$  (A).  $5 \times 10^6$  RMA or RMA-KR were injected i.v into C57BL/6 mice depleted or not for T cells. Kaplan-Meier analyses of mice survival are presented and were analysed according to the log-rank (Mantel-Cox) test (B). n.s: non significant.

### Figure S2: Analysis of ZsGreen+ cells

Example of analysis of the percentage of ZsGreen+ cells upon injections i.v of  $5 \times 10^7$  RMA or RMA flow cytometry.

### Figure S3: Immunoediting of RMA KR cells

$5 \times 10^7$  RMA or RMA-KR were injected i.v and mice were sacrificed at D9 for RMA tumor bearing mice or D13 for RMA KR tumor bearing mice. Cells within the spleen were then stained for H2Kb and Rae1- $\beta$ . Data were analyzed by flow cytometry. The experiments included at least 3 mice per group.

### Figure S4: Repertoire analysis of NK cells in tumor bearing mice

For the repertoire analysis,  $5 \times 10^7$  RMA or RMA-KR were injected i.v and mice were sacrificed at D7 for RMA bearing mice and D11 for RMA KR bearing mice. Splenic NK cells were enriched and stained with the repertoire panel by flow cytometry (A). The analysis of NK cell subsets at early vs late time points was performed using Phenograph algorithm (B).

### Figure S5: Degranulation assay in response to various stimuli

$5 \times 10^7$  RMA or RMA-KR were injected i.v and mice were sacrificed at D9 for RMA tumor bearing mice or D13 for RMA KR tumor bearing mice. The percentage of CD107a<sup>+</sup> NK cells was tested in response to various stimuli (plate bound anti NK1.1 used at different concentrations, anti NKG2D, anti Ly49D, anti NKp46, IL-12/18 and IL-15 cytokines and PMA/ionomycine or upon coculture with RMA KO at a ratio 1:1 after 4 hours).

## Figure S6: ICP staining

$5 \times 10^7$  RMA or RMA-KR were injected i.v and mice were sacrificed at late time point (D9 and D13). Staining for Tim-3 and TIGIT are presented in the different conditions.

## References

1. Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T. & Ugolini, S. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* **9**, 10 (2008).
2. Lanier, L. L. NK CELL RECOGNITION. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 225–274 (2005).
3. Guerra, N. *et al.* NKG2D-Deficient Mice Are Defective in Tumor Surveillance in Models of Spontaneous Malignancy. *Immunity* **28**, 571–580 (2008).
4. Guillerey, C. *et al.* Immunosurveillance and therapy of multiple myeloma are CD226 dependent. *J. Clin. Invest.* **125**, 2077–2089 (2015).
5. Halftack, G. G. *et al.* Enhanced in vivo growth of lymphoma tumors in the absence of the NK-activating receptor NKp46/NCR1. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **182**, 2221–2230 (2009).
6. Watzl, C. & Long, E. O. Signal transduction during activation and inhibition of natural killer cells. *Curr Protoc Immunol* **Chapter 11**, Unit 11.9B (2010).
7. Aptsiauri, N., Ruiz-Cabello, F. & Garrido, F. The transition from HLA-I positive to HLA-I negative primary tumors: the road to escape from T-cell responses. *Curr. Opin. Immunol.* **51**, 123–132 (2018).
8. Cerwenka, A. & Lanier, L. L. Natural killer cells, viruses and cancer. *Nat. Rev. Immunol.* **1**, 41–49 (2001).
9. Barry, K. C. *et al.* A natural killer-dendritic cell axis defines checkpoint therapy-responsive tumor microenvironments. *Nat. Med.* **24**, 1178–1191 (2018).
10. Böttcher, J. P. *et al.* NK Cells Stimulate Recruitment of cDC1 into the Tumor Microenvironment Promoting Cancer Immune Control. *Cell* **172**, 1022–1037.e14 (2018).
11. van den Broek, M. F., Kägi, D., Zinkernagel, R. M. & Hengartner, H. Perforin dependence of natural killer cell-mediated tumor control in vivo. *Eur. J. Immunol.* **25**, 3514–3516 (1995).
12. Pardo, J., Balkow, S., Anel, A. & Simon, M. M. Granzymes are essential for natural killer cell-mediated and perf-facilitated tumor control. *Eur. J. Immunol.* **32**, 2881–2887 (2002).
13. Smyth, M. J. *et al.* Perforin is a major contributor to NK cell control of tumor metastasis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **162**, 6658–6662 (1999).
14. López-Soto, A., Gonzalez, S., Smyth, M. J. & Galluzzi, L. Control of Metastasis by NK Cells. *Cancer Cell* **32**, 135–154 (2017).
15. Chockley, P. J. *et al.* Epithelial-mesenchymal transition leads to NK cell-mediated metastasis-specific immunosurveillance in lung cancer. *J. Clin. Invest.* **128**, 1384–1396 (2018).
16. Bi, J. & Tian, Z. NK Cell Exhaustion. *Front. Immunol.* **8**, 760 (2017).
17. Ljunggren, H. G. & Kärre, K. In search of the ‘missing self’: MHC molecules and NK cell

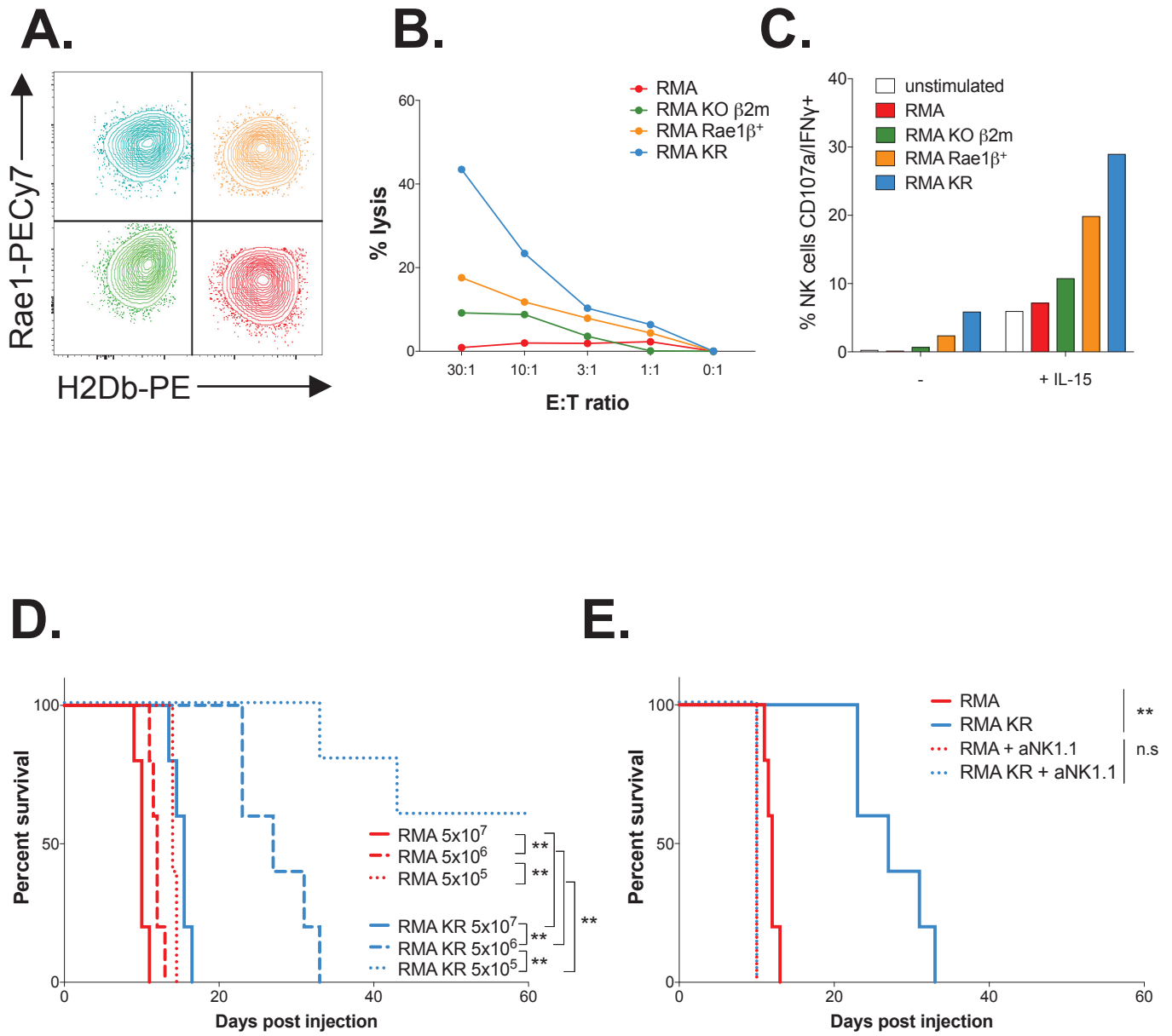


recognition. *Immunol Today* **11**, 44 (1990).

18. Takeda, K. *et al.* IFN- $\gamma$  production by lung NK cells is critical for the natural resistance to pulmonary metastasis of B16 melanoma in mice. *J. Leukoc. Biol.* **90**, 777–785 (2011).
19. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
20. Ribas, A. & Wolchok, J. D. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science* **359**, 1350–1355 (2018).
21. Wang, Q. & Wu, X. Primary and acquired resistance to PD-1/PD-L1 blockade in cancer treatment. *Int. Immunopharmacol.* **46**, 210–219 (2017).
22. Prager, I. *et al.* NK cells switch from granzyme B to death receptor-mediated cytotoxicity during serial killing. *J. Exp. Med.* jem.20181454 (2019). doi:10.1084/jem.20181454
23. Bach, E. A., Aguet, M. & Schreiber, R. D. The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 563–591 (1997).
24. Grégoire, C. *et al.* The trafficking of natural killer cells. *Immunol Rev* **220**, 82 (2007).
25. Deguine, J. & Bousso, P. Dynamics of NK cell interactions in vivo. *Immunol. Rev.* **251**, 154–159 (2013).
26. Deguine, J., Breart, B., Lemaître, F., Di Santo, J. P. & Bousso, P. Intravital imaging reveals distinct dynamics for natural killer and CD8(+) T cells during tumor regression. *Immunity* **33**, 44 (2010).
27. D’Aloia, M. M., Zizzari, I. G., Sacchetti, B., Pierelli, L. & Alimandi, M. CAR-T cells: the long and winding road to solid tumors. *Cell Death Dis.* **9**, 282 (2018).
28. Marçais, A. *et al.* The metabolic checkpoint kinase mTOR is essential for IL-15 signaling during the development and activation of NK cells. *Nat. Immunol.* **15**, 749–757 (2014).
29. Mortier, E., Woo, T., Advincula, R., Gozalo, S. & Ma, A. IL-15R $\alpha$  chaperones IL-15 to stable dendritic cell membrane complexes that activate NK cells via trans presentation. *J. Exp. Med.* **205**, 1213–1225 (2008).
30. Lucas, M., Schachterle, W., Oberle, K., Aichele, P. & Diefenbach, A. Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15. *Immunity* **26**, 503–517 (2007).
31. Marcus, A. *et al.* Tumor-Derived cGAMP Triggers a STING-Mediated Interferon Response in Non-tumor Cells to Activate the NK Cell Response. *Immunity* **49**, 754-763.e4 (2018).
32. Seo, H. *et al.* IL-21-mediated reversal of NK cell exhaustion facilitates anti-tumour immunity in MHC class I-deficient tumours. *Nat. Commun.* **8**, 15776 (2017).
33. Ardolino, M. *et al.* Cytokine therapy reverses NK cell anergy in MHC-deficient tumors. *J. Clin. Invest.* **124**, 4781–4794 (2014).
34. Ohs, I. *et al.* Restoration of Natural Killer Cell Antimetastatic Activity by IL12 and Checkpoint Blockade. *Cancer Res.* **77**, 7059–7071 (2017).

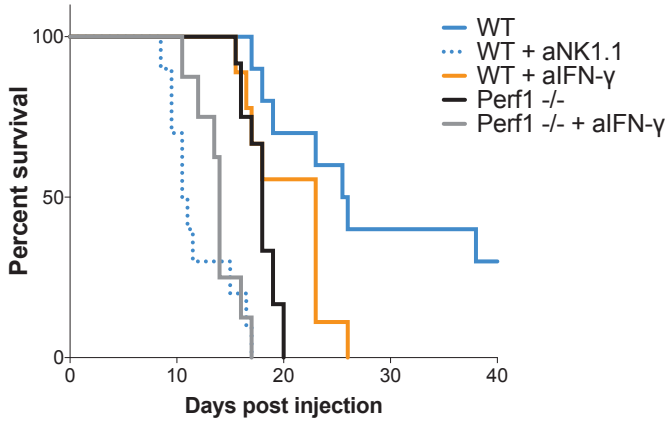


**Figure 1**



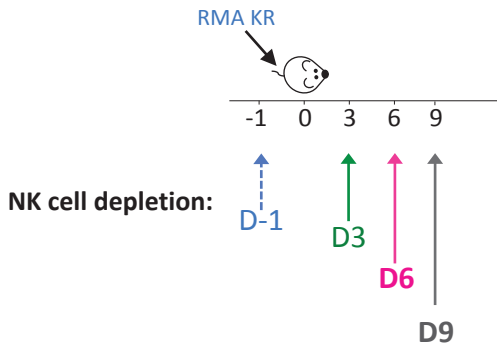
**Figure 2**

**A.**

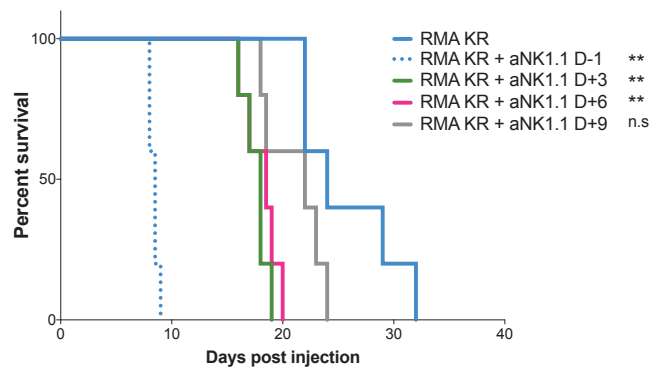


	WT	WT + aNK1.1	WT + aIFN- $\gamma$	Perf1 <sup>-/-</sup>	Perf1 <sup>-/-</sup> + aIFN- $\gamma$
WT		p<0,0001	p=0,0002	p<0,0001	p<0,0001
WT + aNK1.1	p<0,0001		p=0,0002	p<0,0001	n.s
WT + aIFN- $\gamma$	p=0,0002	p=0,0002		p=0,038	p=0,0004
Perf1 <sup>-/-</sup>	p<0,0001	p<0,0001	p=0,038		p=0,0001
Perf1 <sup>-/-</sup> + aIFN- $\gamma$	p<0,0001	n.s	p=0,0004	p=0,0001	

**B.**

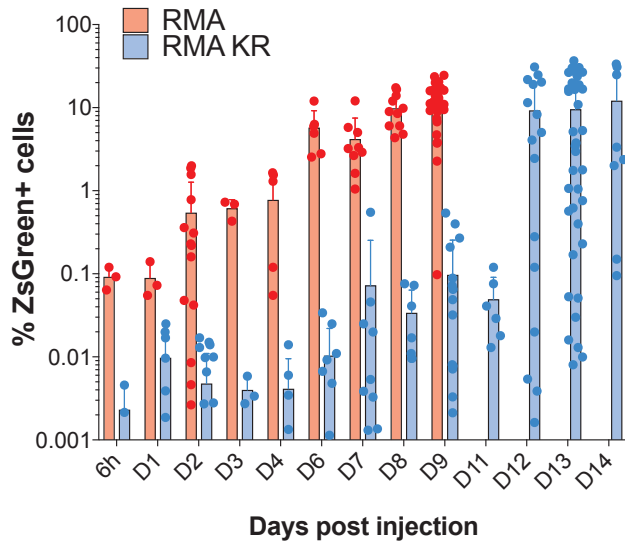


**C.**

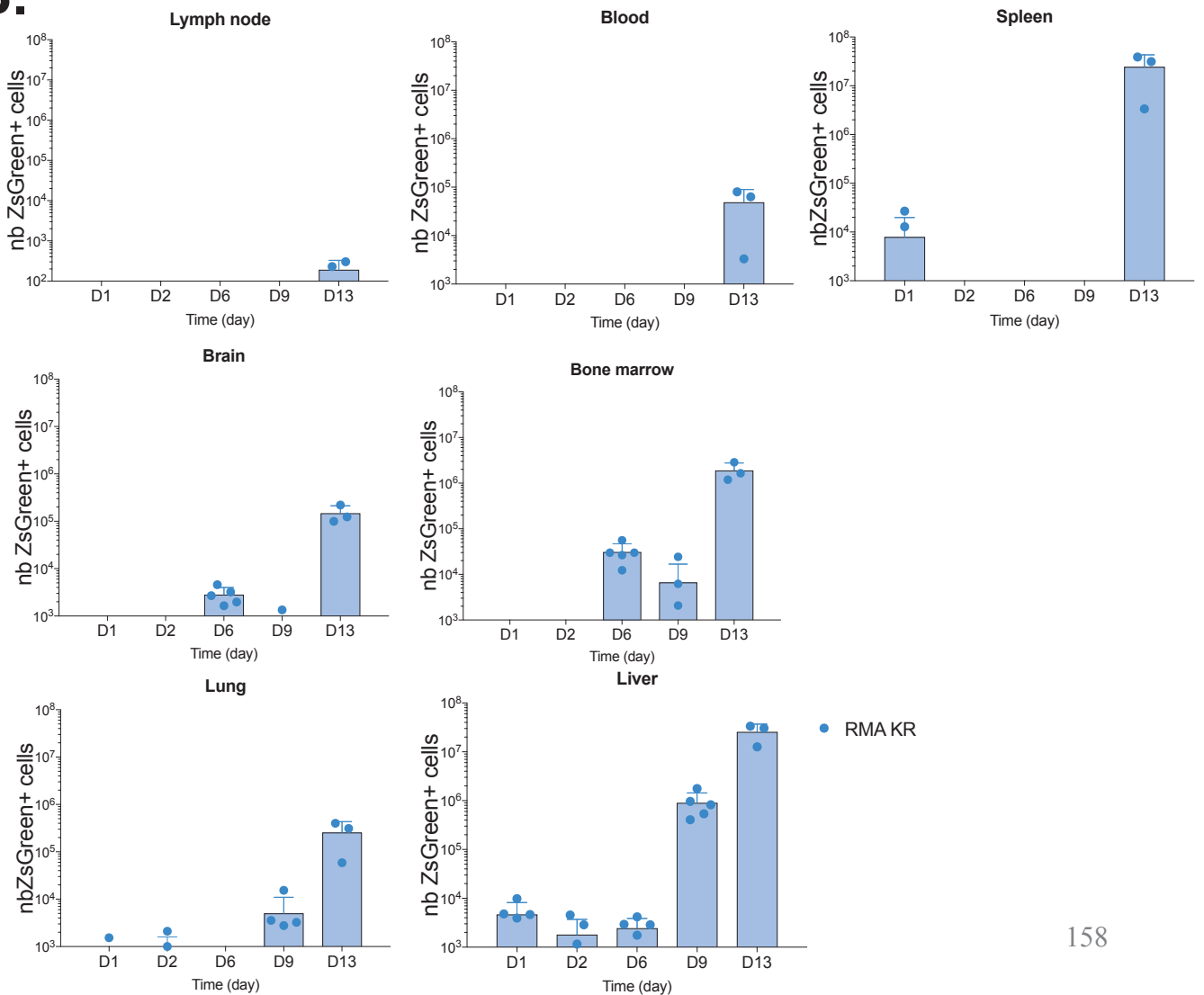


**Figure 3**

**A.**

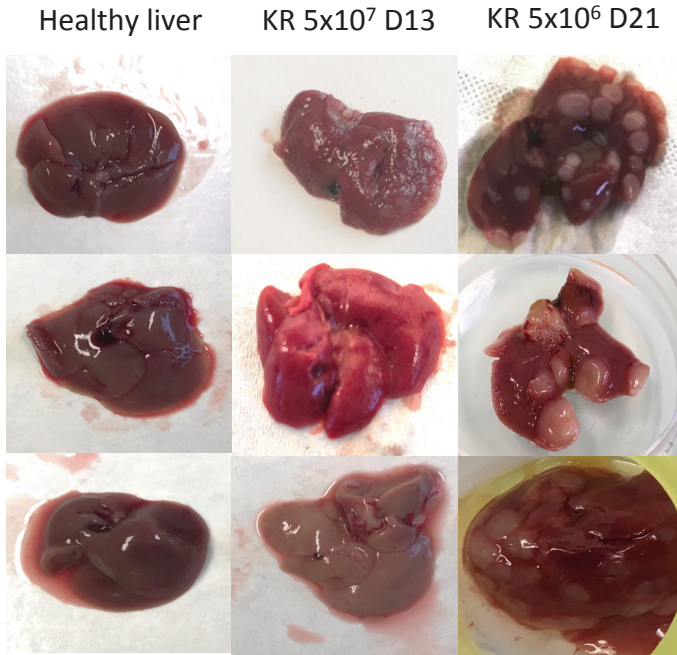


**B.**

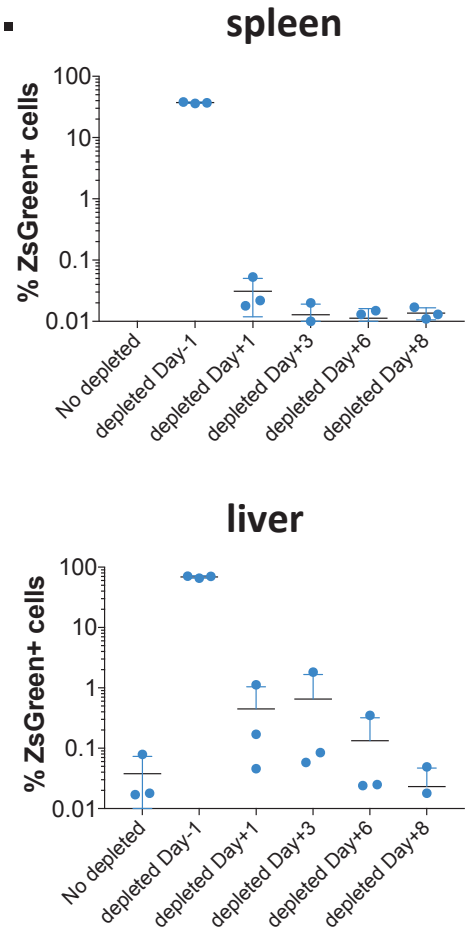


**Figure 4**

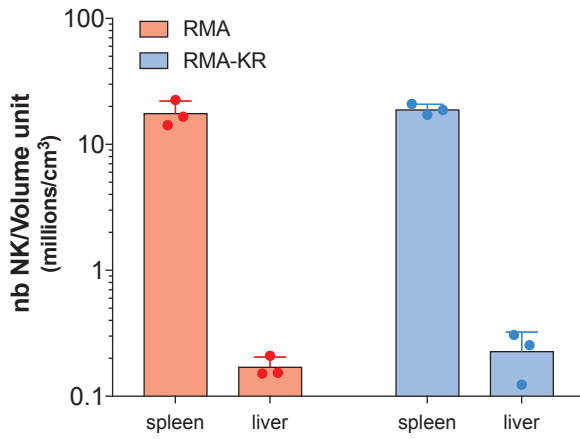
**A.**



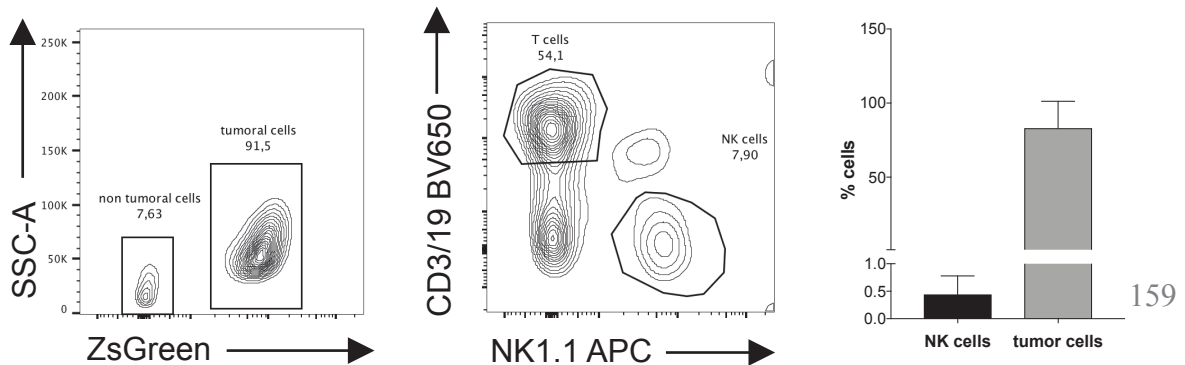
**B.**



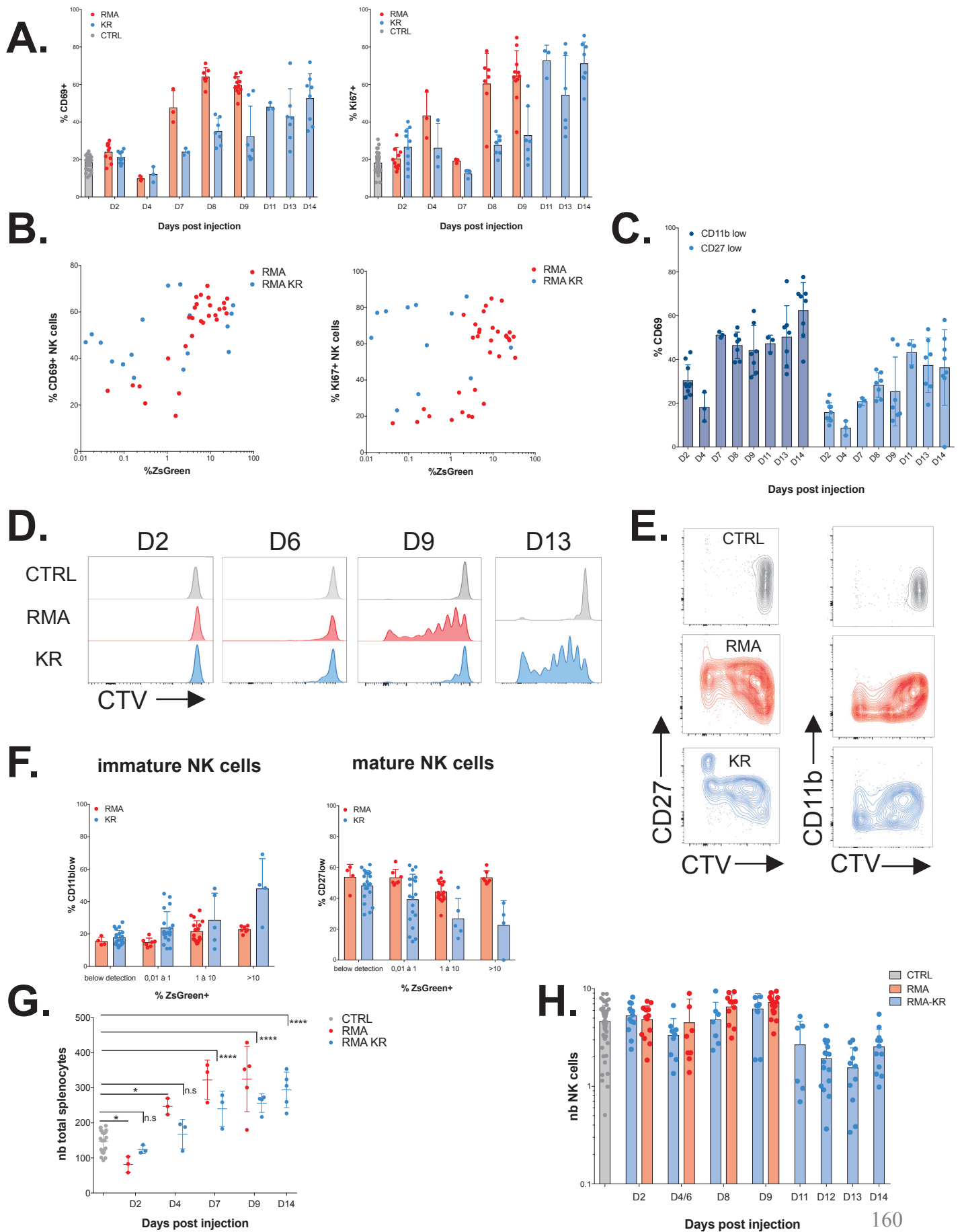
**C.**



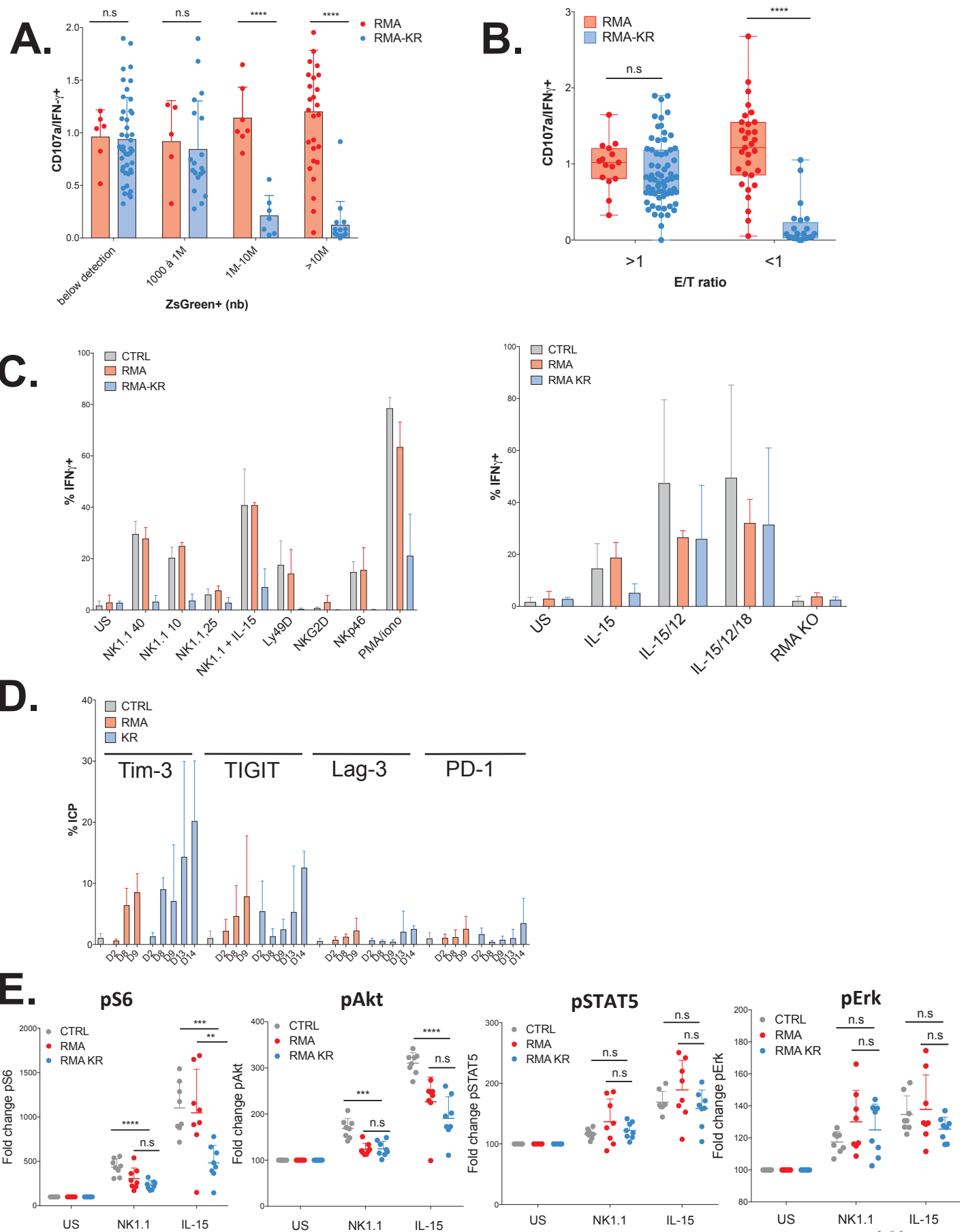
**D.**



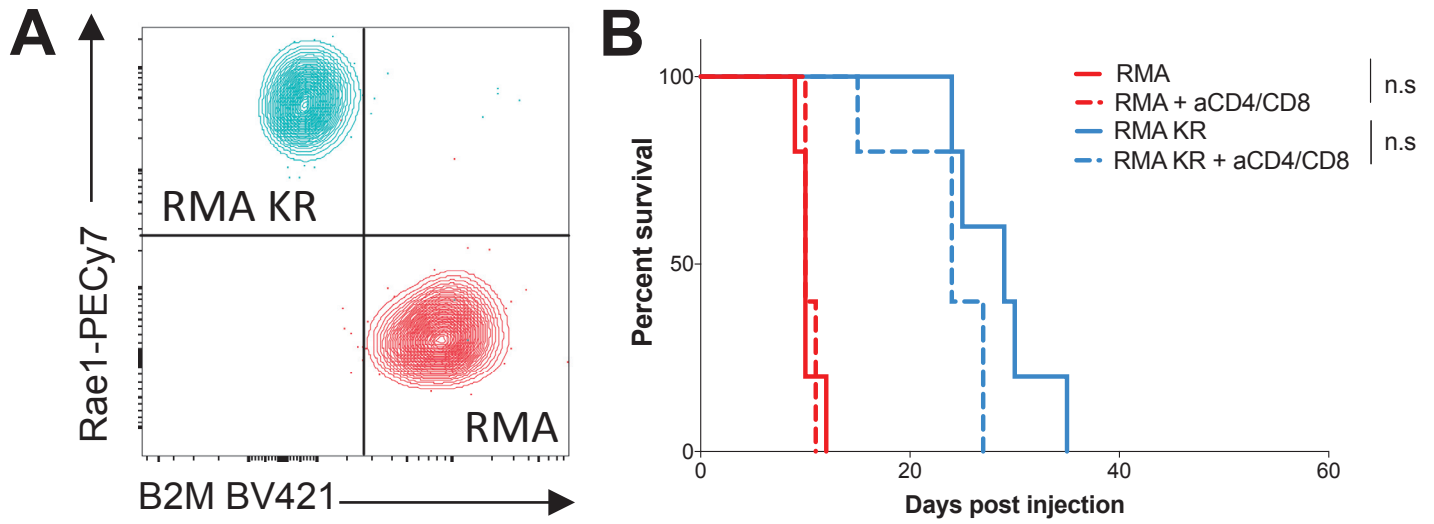
**Figure 5**



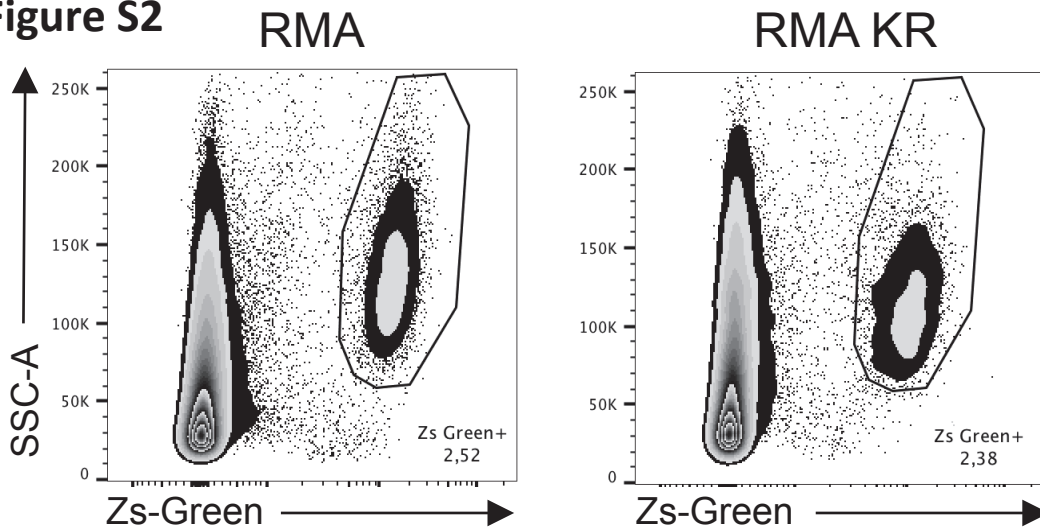
**Figure 6**



**Figure S1**



**Figure S2**



**Figure S3**

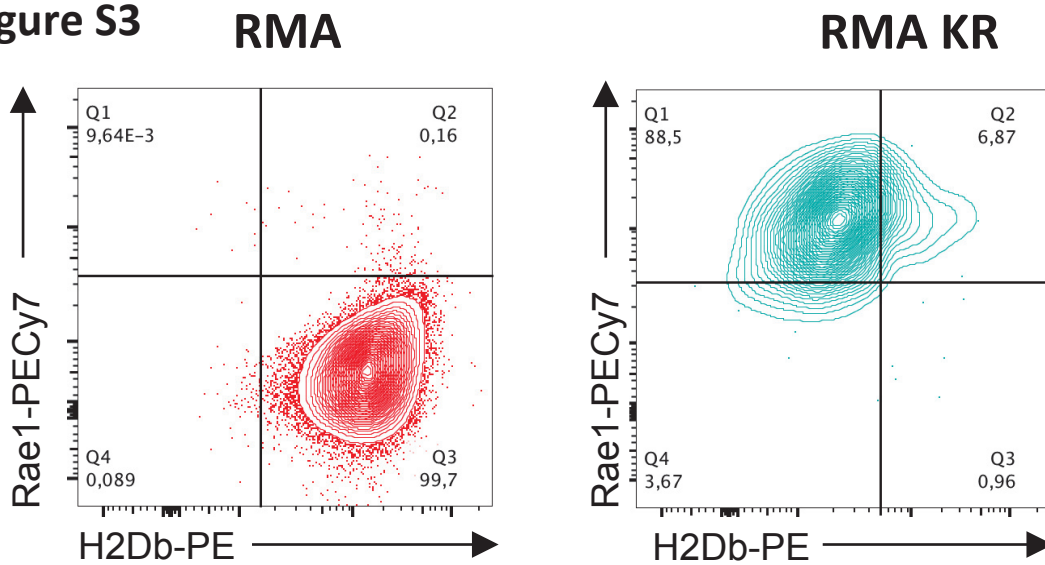
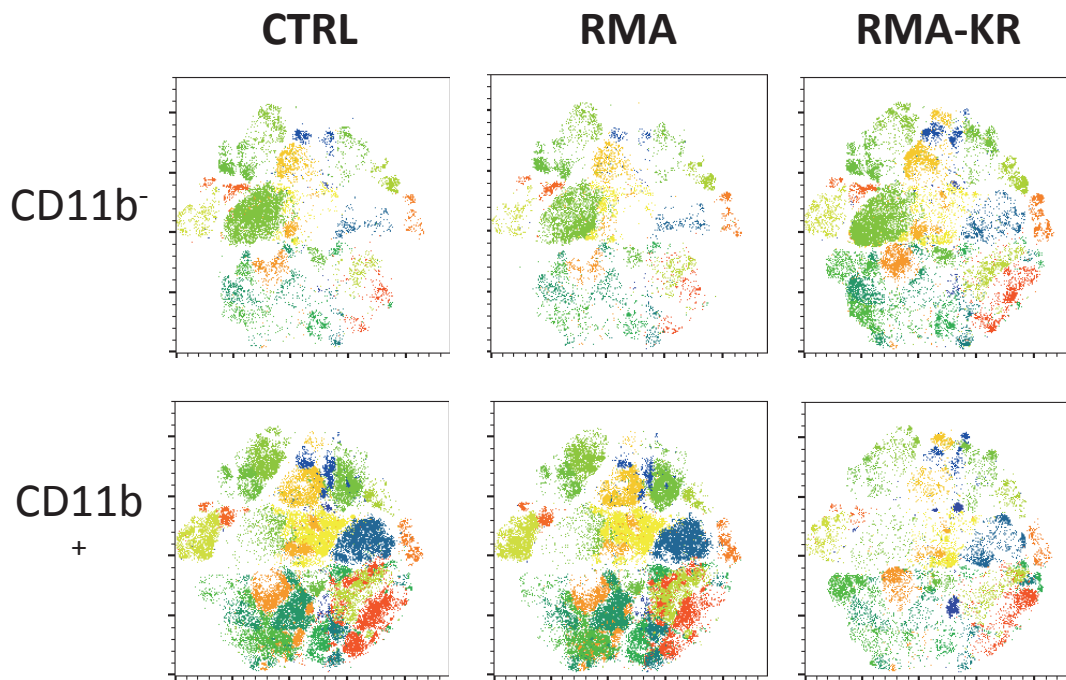


Figure S4

**A**

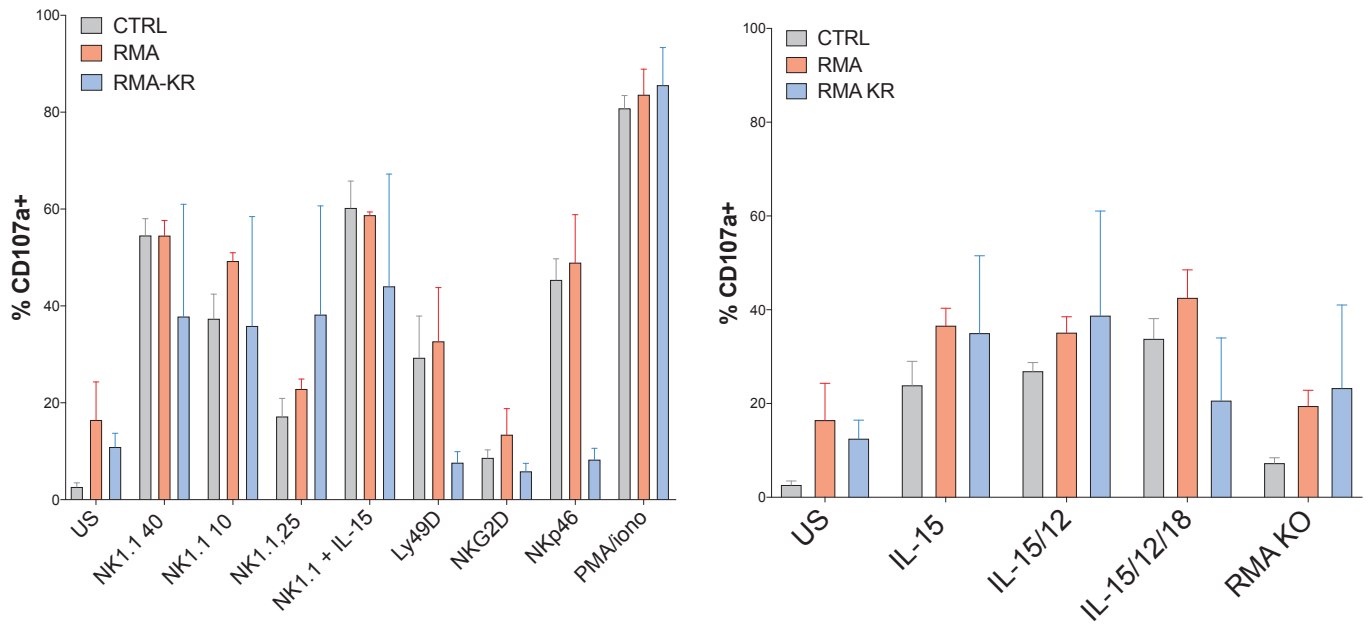
	Fluorochrome	Antibody
UV1	BUV395	Ly49G2
UV2	BUV496	NKG2A
UV3	BUV737	CD27
V1	Pac. Blue	Ly49A
V2	VioGreen	Ly49D
V3	BV605	CD3e/CD19
V4	BV650	KLRG1
V5	BV711	Ly49I
V6	BV785	Ly49H
B1	<i>FITC</i>	<b>ZsGreen</b>
B2	PerCP Cy5.5	NKp46
Y1	<i>PE</i>	<b>Tim-3</b>
Y2	PEDazzle 594	DNAM-1
Y3	<b>7AAD</b>	<i>Viability</i>
Y4	PECy7	Ly49C
R1	APC	NK1.1
R2	APC-R700	CD11b
R3	APC-Vio770	Ly49F

**B**

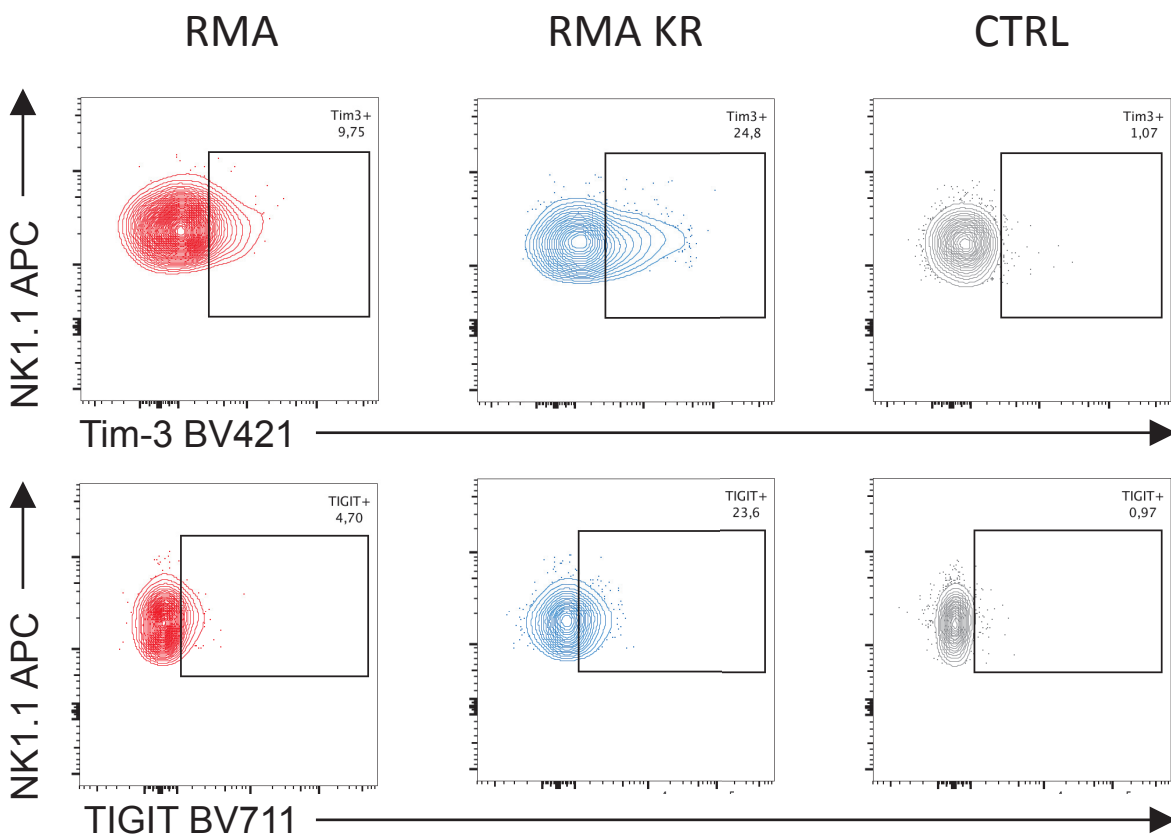




**Figure S5**



**Figure S6**



**Table S1**

<b>Mouse Antigen</b>	<b>Clone</b>	<b>flurorochromes</b>
B 2 microglobulin	S19.8	BV421
CD 3	145-2C11	BV650
CD 11b	M1/70	AlexaF 700
CD 19	1D3	BV650
CD 27	LG.3A10	BUV737
CD 45.1	A20	BUV395
CD 45.2	104	AlexaF 700
CD 69	H1.2F3	PE Cy7
CD107a (LAMP-1)	1D4B	FITC
CD122	TM-b1	APC
CD223 (Lag-3)	eBioC9B7W	PE
CD226 (DNAM-1)	10 E5	PE-Dazzle594
CD279 (PD-1)	J43	PerCP-eFluor710
H-2Db	KH95	PE
H-2Kb	AF6-88.5	BV510
IFNg	XMG1.2	PE
Ki-67	SolA15	AlexaF 647
NK1.1	PK136	APC
Nkp46	29A1.4	AlexaF 647
phospho-Akt (Ser 473)	M89-61	Pe-CF594
phospho-ERK1/2 (T202/pY204)	20A	AF488
phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser 235/236)	D57.2.2E	PE
phospho-STAT5 (Y694)	47/stat5(pY694)	AF488
Rae1 Pan	REA723	PEvio770
TIGIT	1G9	BV711
Tim 3	215008	PE

	RMA	E077.1	YAC-1	B16	NK	In vivo RMA	In vivo RMA-KR
SLAMF1/ CD150	+	-	-	+	+/-	+/-	+/-
SLAMF2/ CD48	++	+	++	-	++	+/-	++/-
SLAMF3/ CD229	++	+	++	-	++	+/-	+/-
SLAMF4/2B4	-	+	-	-	++	-	-
SLAMF5/ CD84	++	+	+/-	-	+	+	-
SLAMF6/ Ly108	-	++	-	-	+		
CD155	++	++	++	-		+/-	+/-
Rae-1	-	++	+	-		-	+/-
NKG2DL	-	++	++	+		-	+/-
ICAM-1	++	+	+/-	-		+	+/-
ICAM-2	++	-	+/-	-			

### **Figure 30: Comparaison de l'expression de différents ligands entre lignées**

L'expression de différents ligands des NKAR par les lignées RMA, E077.1, YAC-1, B16 et par les cellules NK a été analysée par cytométrie de flux. De plus, les cellules RMA ou RMA-KR ont été injectées par voie intraveineuse dans des souris C57BL/6. Les souris ont été sacrifiées à jour 9 (souris injectées avec la lignée RMA) et à jour 13 (souris injectées avec la lignée RMA-KR) et l'expression de ces différents ligands a été mesurée par cytométrie de flux.

- : non exprimé, +/- faiblement exprimé, + : exprimé, ++ : fortement exprimé. Cases grises : expression non mesurée.

## 2.1.2 Résultats complémentaires de l'article 1

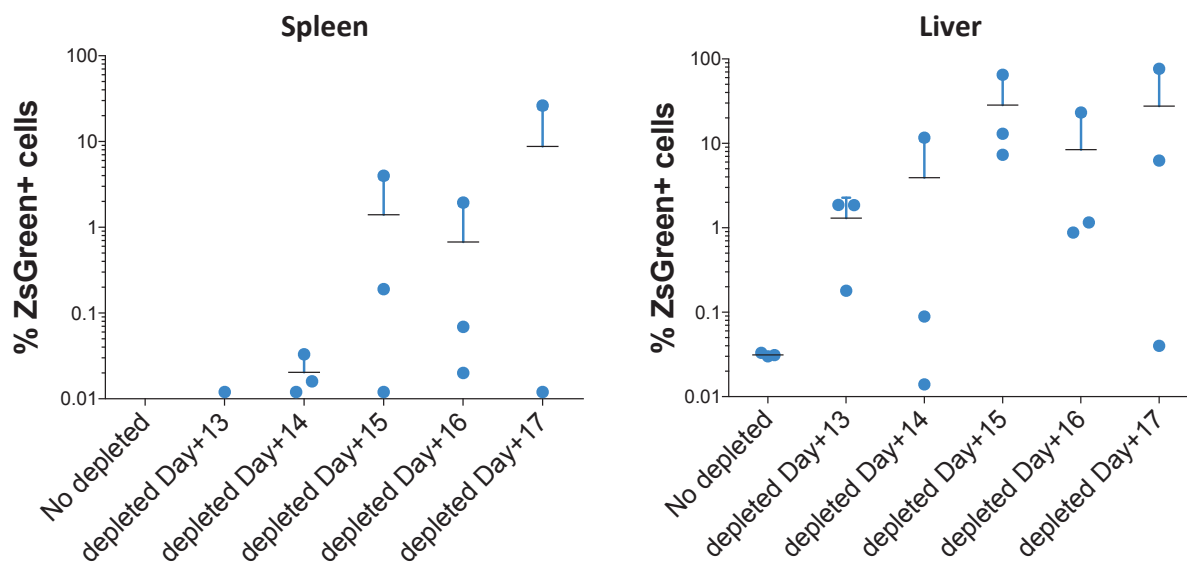
### a- Phénotypage des lignées

Nous avons donc généré un nouveau modèle murin de lymphome fortement immunogène pour les cellules NK : le modèle RMA-KR. Le choix d'introduire Rae1- $\beta$  dans la lignée parentale est basé sur le phénotypage des cellules RMA réalisé au préalable (Figure 30). En effet, nous avons tout d'abord déterminé le niveau d'expression de différents ligands des NKaR (NKG2D, DNAM-1 et les SLAM qui sont exprimés de façon homotypique) sur la lignée RMA comparée à d'autres lignées cibles classiquement utilisées telles que les cellules de cancer mammaire E077.1, la lignée leucémique YAC-1 ou la lignée de mélanome B16. On sait que NKG2D et DNAM-1 sont exprimés par les cellules NK (DNAM-1 étant exprimé sur une fraction), par contre nous avons souhaité cartographier l'expression des récepteurs SLAM (SLAMF1 à SLAMF6) sur les cellules NK qui est moins bien établie.

La lignée RMA exprime de nombreux ligands des NKaR tels que les protéines SLAM, le ligand partagé de DNAM-1/TIGIT/CD96, CD155 et les protéines ICAM-1 et 2 liant LFA-1 sur les cellules NK. En revanche, cette lignée n'exprime aucun ligand de NKG2D. D'autres ligands, tels que les ligands des ICP (Galectine 9 pour Tim-3, le CMH de classe II pour Lag3 ou encore PD-L1 pour PD-1) peuvent s'ajouter à cette liste qui sera donc complétée par la suite.

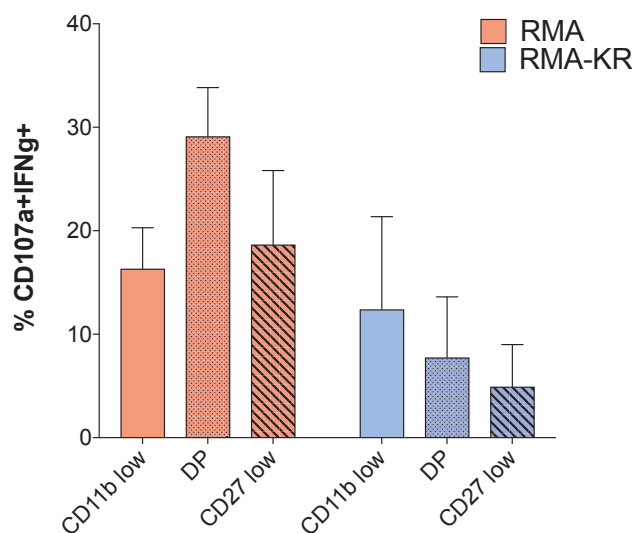
A noter que nous avons également introduit l'expression de H60, un autre ligand de NKG2D, dans les RMA et ainsi généré les lignées RMA-H60<sup>+</sup> et RMA-H60<sup>-</sup> déficientes pour le CMH de classe I, qui pourront servir pour des études postérieures.

Une des principales limites de notre modèle est que nous ne contrôlons pas les modifications qui peuvent survenir *in vivo* et conduire à la dérive de l'une ou de l'autre lignée. Ces modifications peuvent être dues à la pression de sélection exercée par le système immunitaire (un processus connu sous le nom d'immuno-édition) et peuvent être des changements dans l'expression des différents ligands. Afin de déterminer si l'expression des principaux ligands est modifiée nous avons appliqué le panel de phénotypage aux lignées injectées *in vivo*.



**Figure 31: Déplétion tardive des cellules NK dans le modèle RMA-KR**

$5 \times 10^6$  RMA-KR ont été injectées par voie intraveineuse dans des souris C57BL/6 de 8 semaines. Les cellules NK ont été déplétées par utilisation d'un anticorps anti NK1.1 à J13, J14, J15, J16 ou J17. Les souris ont été sacrifiées à J20 puis la rate et le foie ont été prélevés. Les cellules ont été comptées et le pourcentage de cellule ZsGreen au sein dans la rate (gauche) ou dans le foie (droite) a été mesuré par cytométrie en flux. Cette expérience a été réalisée une seule fois et incluait 3 souris par groupe.



**Figure 32: Fonctionnalité des cellules NK selon la maturation**

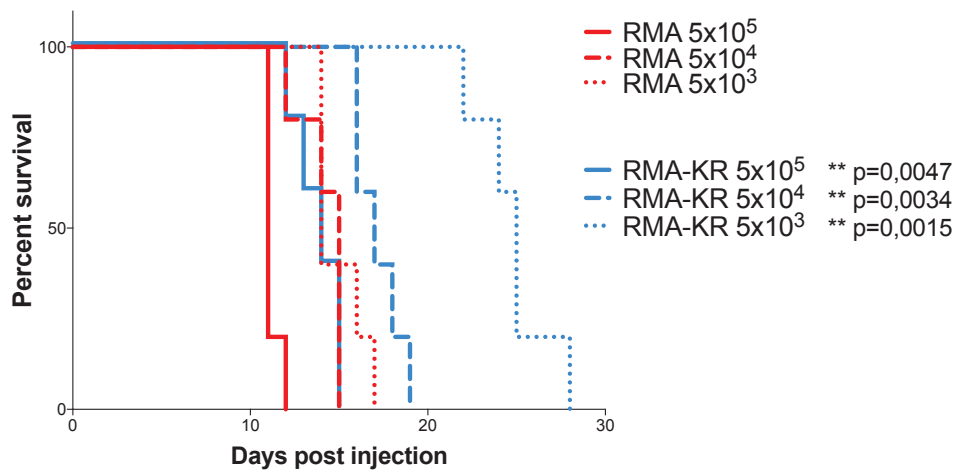
$5 \times 10^7$  RMA-KR ont été injectées par voie intraveineuse dans des souris C57BL/6 de 8 semaines. Aux stades terminaux (J9 pour les RMA et J13 pour les RMA KR), les souris ont été sacrifiées et la rate a été prélevée. Les splénocytes ont ensuite été restimulés avec un anti NK1.1 (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) et le pourcentage de cellules  $\text{CD107a}^+ \text{IFN-}\gamma^+$  parmi les cellules NK  $\text{CD11b}^{\text{low}}$ ,  $\text{CD11b}^+ \text{CD27}^+$  (DP) ainsi que  $\text{CD11b}^+ \text{CD27}^{\text{low}}$  a été mesuré par cytométrie en flux. Cette expérience a été réalisée une seule fois et incluait 3 souris par groupe.

Mis à part l'expression plus importante de SLAMF5 et d'ICAM-1 par les cellules RMA, nous n'avons pas observé d'autre différence significative entre les RMA et les RMA-KR. Cependant, nous pouvons noter que l'expression de la plupart des ligands est diminuée dans les cellules *in vivo* comparée aux lignées cultivées *in vitro*.

## **b- Données complémentaires de l'article 1**

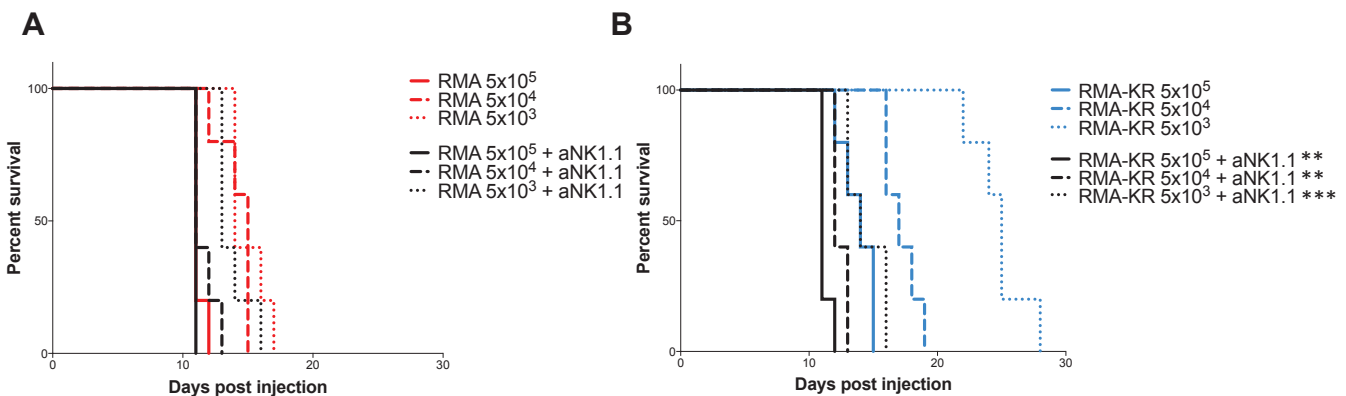
Comme présenté dans l'article 1, nous avons déplété les cellules NK à différents temps (J-1, J1, J3, J6 et J9) post injection de cellules RMA et RMA-KR par voie intraveineuse. L'analyse au jour 10 de la pousse tumorale montre que les cellules NK semblent essentielles dans les premiers jours (jusqu'à J3) et parviennent à éliminer la quasi totalité des cellules tumorales alors que des déplétions plus tardives n'ont que peu d'effet sur la croissance de la tumeur dans le foie et la rate. En revanche, nous avons également déplété les cellules NK à des stades plus tardifs (J13, 14, 15, 16 et 17) et analysé le pourcentage de cellules ZsGreen<sup>+</sup> dans les deux organes au jour 20 (Figure 31). L'effet inverse est ici observé. En effet, plus les cellules NK sont déplétées tardivement, plus l'effet est bénéfique pour la tumeur ce qui sous-entendrait un rôle pro tumoral des cellules NK aux stades tardifs. L'expérience n'ayant été réalisée qu'une seule fois, elle sera répétée pour conclure sur ces données.

Dans l'article 1, nous avons montré que les cellules NK de la rate de souris RMA KR sont peu répondeuses aux stades terminaux en présence d'une charge tumorale élevée. A ce stade, les cellules NK sont également caractérisées par un phénotype de type activé marqué par la hausse d'expression de CD69 et Ki67 et un fort taux prolifératif conduisant à une surreprésentation de la population immature (CD11b<sup>-</sup>). Afin de déterminer si l'hypo-réponse globale est causée par la diminution de la population mature (CD11b<sup>+</sup>), nous avons analysé les capacités fonctionnelles des cellules NK en distinguant les différents sous types de maturation (Figure 32). Toutes les sous populations sont touchées et la perte de fonction ne peut donc pas être expliquée par les défauts observés dans la maturation.



**Figure 33: La pousse des tumeurs solides RMA-KR est ralentie *in vivo***

5x10<sup>5</sup>, 5x10<sup>4</sup> ou 5x10<sup>3</sup> cellules RMA ou RMA-KR ont été injectées par voie sous-cutanée dans le flanc droit de souris C57BL/6. La croissance de la tumeur a été mesurée par utilisation d'un pied à coulisse et les souris ont été sacrifiées lorsque le plus grand diamètre de la tumeur a atteint 17 mm. Les courbes de survie sont présentées et ont été analysées par la méthode de Kaplan-Meier et le test statistique Log-Rank (Mantel-Cox). Les p-values indiquées correspondent à la comparaison entre les conditions RMA et RMA-KR pour une même dose. Cette expérience incluait 5 souris par groupe et a été réalisée deux fois.



**Figure 34: La formation de tumeur solide RMA-KR est contrôlée par les cellules NK**

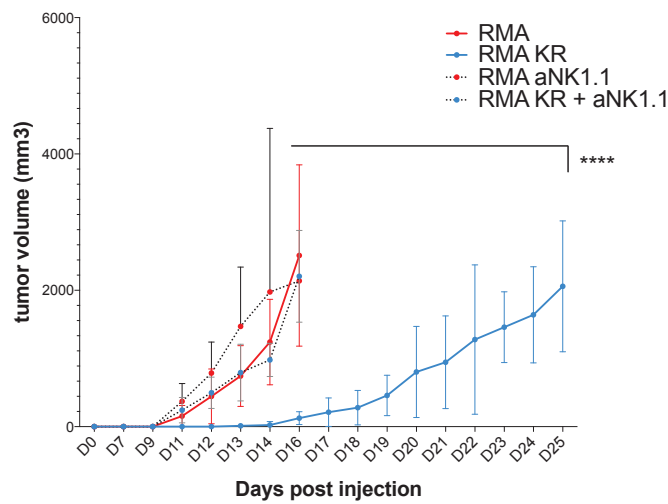
5x10<sup>5</sup>, 5x10<sup>4</sup> ou 5x10<sup>3</sup> cellules RMA (A) ou RMA-KR (B) ont été injectées par voie sous-cutanée dans le flanc gauche de souris C57BL/6 déplétées ou non en cellules NK le jour précédent (J-1) par injection intra-péritonéale d'un anticorps anti NK1.1 (clone PK136). La formation de la tumeur a été mesurée par utilisation d'un pied à coulisse et les souris ont été sacrifiées lorsque le plus grand diamètre de la tumeur a atteint 17 mm. Les courbes de survie sont présentées et ont été analysées par la méthode de Kaplan-Meier et le test statistique Log-Rank (Mantel-Cox). Cette expérience incluait 5 souris par groupe et a été réalisée une fois.

### c- Comparaison avec le modèle d'injection en sous-cutané

Comme nous l'avons vu, les cellules NK jouent essentiellement un rôle dans le contrôle des tumeurs hématologiques et le développement de métastases. Nous avons fait le choix d'injecter les cellules RMA et RMA-KR par voie intraveineuse (i.v) afin d'établir des tumeurs dans la rate où elles rencontrent un nombre important d'effecteurs. De plus, cette méthode d'injection conduit également à l'apparition de métastases dans des organes non lymphoïdes comme le foie, les poumons ou le cerveau. Dans un souci de comparaison, nous avons souhaité valider certains de nos résultats dans un modèle de tumeur solide utilisant les mêmes lignées. Pour cela, nous avons injecté différentes doses de cellules RMA ou RMA-KR par voie sous-cutanée (s.c) dans le flanc de souris C57BL/6. La pousse de la tumeur a ensuite été mesurée à différents jours à l'aide d'un pied à coulisse. Du point de vue de l'éthique animale, une tumeur ayant un diamètre supérieur à 17 mm est considérée comme un point limite, ce qui veut dire que l'animal est sacrifié lorsque ce point limite est atteint. Nous avons ainsi établi les courbes de survie présentées en [Figure 33](#).

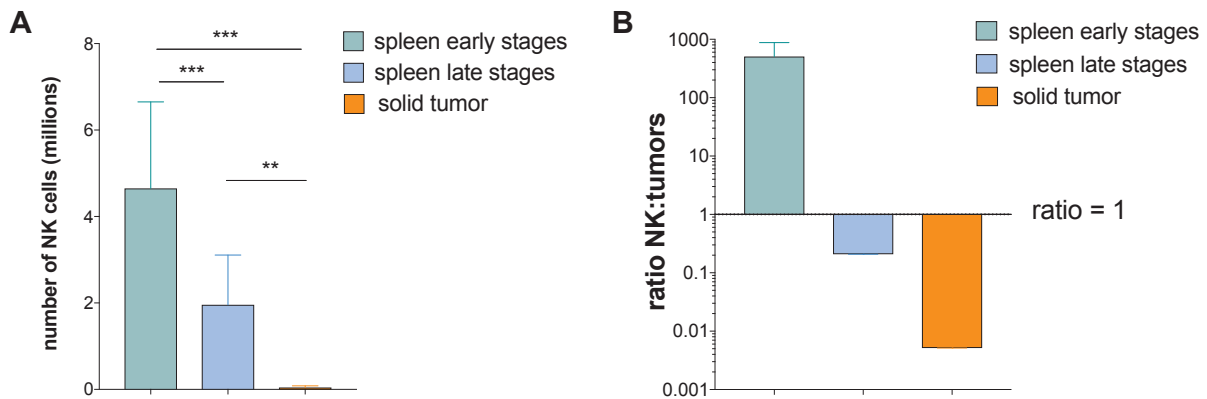
Les souris injectées avec les cellules RMA (souris RMA) développent rapidement des tumeurs quelle que soit la dose injectée ( $5 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^4$ , ou  $5 \times 10^3$ ) ce qui souligne à nouveau le caractère non contrôlé et agressif de cette lignée tumorale. En revanche, la pousse tumorale dans les souris injectées avec les RMA-KR (souris RMA-KR) est retardée par rapport aux RMA (à dose équivalente). Ces résultats apportent la preuve d'un contrôle des RMA-KR *in vivo*, probablement exercé par les cellules NK. Afin de le valider, nous avons ensuite injecté les trois mêmes doses de RMA ou RMA-KR dans des souris déplétées ou non pour les cellules NK ([Figure 34](#)). Pour les souris RMA, aucune différence significative n'a été observée entre les conditions déplétées ou non déplétées. A contrario, un retard dans la pousse tumorale des RMA-KR a pu être mise en évidence lorsque les cellules NK ont été déplétées. Ces résultats sont valables pour chaque dose injectée et sont amplifiés à mesure que la dose décroît. Ceci confirme l'importance du contrôle exercé par les cellules NK sur cette tumeur. Enfin, ces données sont corroborées par l'analyse





**Figure 35: Mesure de la pousse tumorale en présence ou absence de cellules NK**

$5 \times 10^4$  cellules RMA ou RMA-KR ont été injectées par voie sous-cutanée dans le flanc droit de souris C57BL/6 déplétées ou non en cellules NK à jour J-1 par injection en intra-péritonéal d'un anticorps anti NK1.1 (PK136). La formation de la tumeur a été mesurée à différents jours par utilisation d'un pied à coulisse à partir du jour où la tumeur devient palpable. Les souris ont été sacrifiées lorsque le plus grand diamètre de la tumeur a atteint 17 mm. \*\*\*\* :  $p < 0,0001$ . La p-value a été calculée en utilisant un test d'ANOVA à deux facteurs et une correction de Tukey. Cette expérience incluait 5 souris par groupe et a été réalisée une fois.



**Figure 36: Nombre de cellules NK infiltrant la tumeur dans le modèle s.c et i.v**

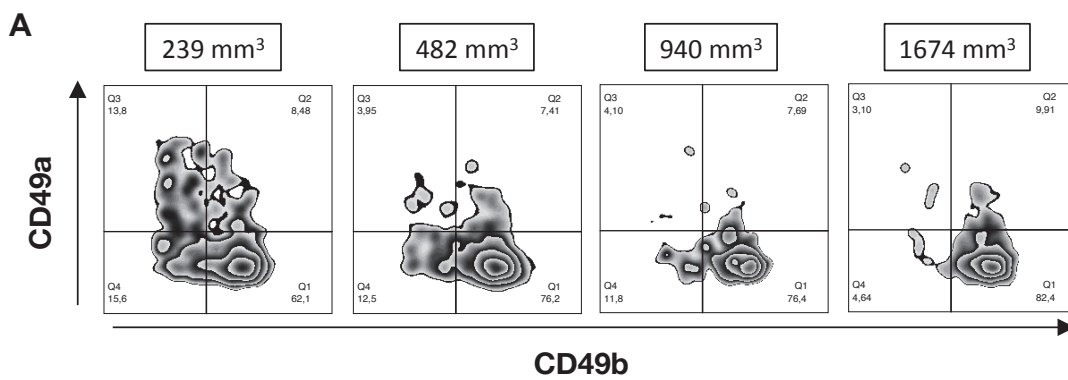
$5 \times 10^7$  RMA-KR ont été injectées par voie intra-veineuse. Les souris ont été sacrifiées à des temps précoces (early stages, J2,  $n=19$ ) ou tardifs (late stages, J13,  $n=29$ ) et la rate a été collectée. Les splénocytes ont ensuite été comptés et analysés par cytométrie en flux.  $5 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^4$  ou  $5 \times 10^3$  cellules RMA-KR ont été injectées par voie sous-cutanée (solid tumor,  $n=6$ ). Le jour du sacrifice de la souris (*i.e* lorsque le plus grand diamètre de la tumeur atteint 17 mm), la tumeur a été excisée, broyée et digérée à la collagénase de type IV. Les cellules ont ensuite été comptées et analysées par cytométrie en flux afin de déterminer le nombre de cellules NK (en millions) infiltrant la tumeur (A) et le ratio NK/cellules tumorales (B). Cette expérience est représentative de 3 expériences indépendantes. L'analyse statistique a été réalisée par utilisation du test de Student de comparaison de données non appariées. \*\* :  $p$ -value  $< 0,005$  et \*\*\* :  $p$ -value  $< 0,0001$ .

d'autres paramètres caractérisant la pousse tumorale : 1) le temps avant l'apparition d'une tumeur détectable et 2) la vitesse de croissance tumorale après apparition de la tumeur (Figure 35). En effet, l'apparition d'une tumeur détectable est observée à jour 16 alors qu'elle survient à jour 11 pour les souris RMA-KR déplétées en cellules NK. Par ailleurs, en présence de cellules NK, neuf jours (J16 à J25) sont nécessaires pour que la tumeur atteigne la taille maximale autorisée alors que cinq jours sont suffisants en l'absence de cellules NK ou lorsque la lignée utilisée n'est pas immunogène pour les cellules NK. Des résultats similaires ont été obtenus pour des doses initiales plus fortes ( $5 \times 10^5$  et  $5 \times 10^4$ ) (données non montrées).

Comme c'est le cas pour le modèle i.v, la formation de tumeurs RMA-KR est donc contrôlée par les cellules NK *in vivo*. Néanmoins, les cellules tumorales réussissent tout de même à échapper à ce contrôle et conduisent au développement de tumeurs solides. Est-ce dû à une mauvaise infiltration par les cellules NK ou à un processus d'épuisement ? Pour répondre à cette question, nous avons tout d'abord mesuré le pourcentage de cellules NK parmi l'infiltrat par cytométrie en flux et les résultats ont été comparés aux données obtenues dans la rate dans le modèle i.v à des temps précoces et à des temps plus tardifs de la pousse tumorale (Figure 36A).

A des temps précoces après l'injection de cellules RMA-KR, la rate comprend environ 3 à 4 millions de cellules NK. La pousse tumorale diminue fortement le nombre de cellules NK spléniques pour atteindre une moyenne d'environ 2 millions. Le nombre de cellules NK infiltrant les tumeurs solides est considérablement inférieur. En effet, pour la plupart des tumeurs, ce nombre est inférieur ou égal à 100 000 cellules. La quantité de matériel disponible est donc nettement inférieure dans le modèle s.c. et l'absence de contrôle efficace pourrait être en partie expliquée par un manque d'infiltration de la tumeur par les cellules NK. Ainsi, les cellules tumorales sont en contact avec un petit nombre d'effecteurs et le ratio effecteurs/cibles, noté E/T, est donc très faible (Figure 36B).

De surcroît, une étude a montré que dans des tumeurs solides induites par le MCA, les cellules NK subissent une conversion en cellules de type ILC-1 avec l'existence d'un phénotype intermédiaire caractérisé par l'expression double de CD49a et de CD49b et une fonctionnalité réduite (Gao et al, 2017). Cette transdifférenciation est induite par le TGF- $\beta$ .

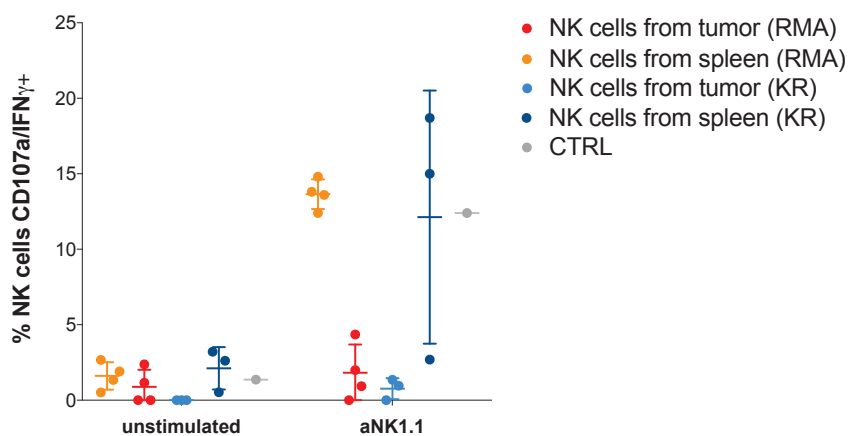


**B**

Volume tumeur	Nombre de NK
239 mm <sup>3</sup>	28350
482 mm <sup>3</sup>	32680
940 mm <sup>3</sup>	40320
1674 mm <sup>3</sup>	109120

**Figure 37: Les cellules NK ne subissent pas de conversion en ILC-1 dans notre modèle RMA-KR sc.**

$5 \times 10^4$  RMA-KR ont été injectées par voie sous-cutanée (n=4). Les souris ont été sacrifiées à J17 après mesure du volume de la tumeur à l'aide d'un pied à coulisse. La tumeur a ensuite été excisée, broyée et digérée à la collagénase de type IV. Les cellules isolées ont été comptées et analysées par cytométrie en flux après immunomarquage de CD49b et CD49a (A). Le pourcentage de chaque population parmi les cellules NK1.1 positives est indiqué ainsi que le volume de la tumeur prélevée. Le nombre de cellules NK en fonction du volume est résumé dans le tableau (B). Cette expérience a été réalisée une fois.



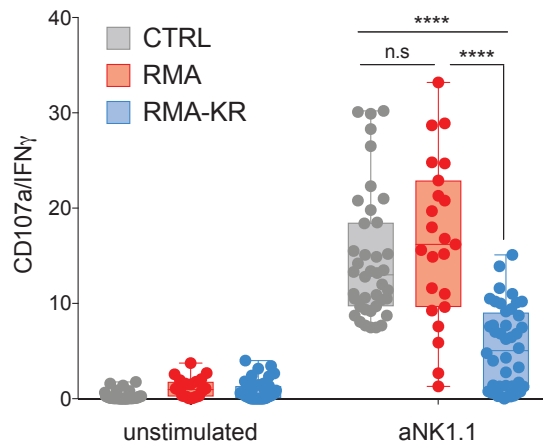
**Figure 38: Fonctionnalité des cellules NK infiltrant les tumeurs**

$5 \times 10^5$  RMA (n=4) ou RMA-KR (n=3) ont été injectées par voie sous-cutanée. Les souris ont été sacrifiées à J10 pour les RMA ou J17 pour les RMA-KR après mesure du volume de la tumeur à l'aide d'un pied à coulisse. La tumeur a ensuite été excisée, broyée et digérée à la collagénase de type IV. La rate de chaque souris a également été prélevée. Les cellules NK infiltrant la tumeur et celles de la rate ont ensuite été purifiées et stimulées avec un anti NK1.1 pendant 4h. Le pourcentage de cellules CD107a+/IFN- $\gamma$ + a été mesuré après marquage anticorps par cytométrie en flux. Cette expérience a été réalisée une fois.

Nous avons donc analysé, par cytométrie de flux, si les cellules NK1.1 positives détectées au sein de la tumeur présentaient ce phénotype (Figure 37). Quatre échantillons ont été analysés et les volumes de chaque tumeur sont indiqués. Nous n'avons pas observé de conversion en « ILC-1-like » mais plutôt une augmentation de la proportion et du nombre de cellules NK (CD49b<sup>+</sup>) et une diminution de la proportion d'ILC-1 (CD49a<sup>+</sup>) parallèlement à la croissance tumorale. Le phénomène de transdifférenciation des cellules NK en ILC-1 semble donc dépendre du modèle tumoral utilisé et le rôle du TGF- $\beta$  peut donc être différent selon les modèles tumoraux.

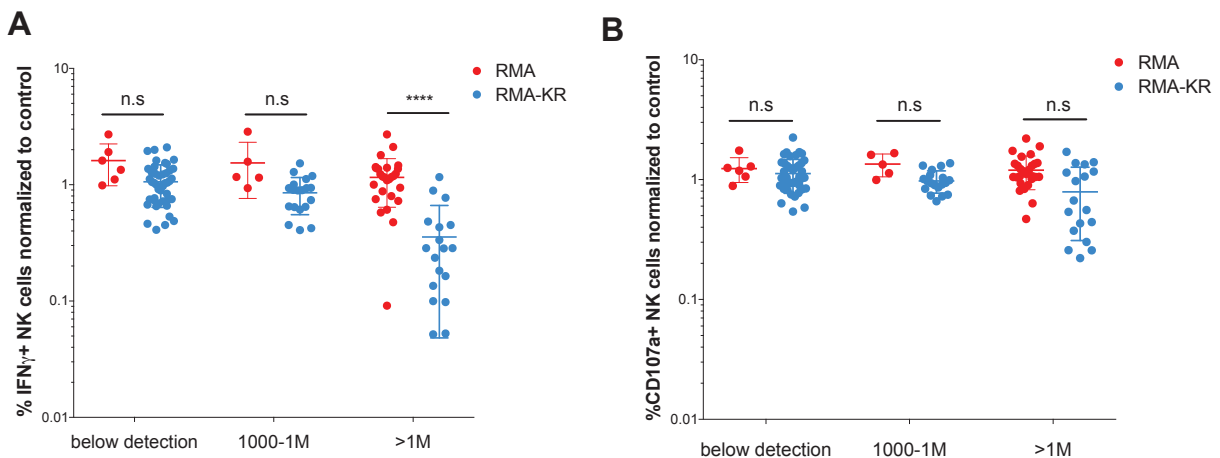
L'ensemble de ces résultats semblent donc montrer que les tumeurs solides formées à partir de RMA-KR sont sous le contrôle des cellules NK bien que peu infiltrées. On peut tout de même observer que le nombre de NK s'accroît et suit la pousse tumorale (Figure 37B). Les cellules NK sont donc recrutées au sein des tumeurs solides ; cependant elles sont présentes en faible quantité ce qui pourraient expliquer qu'elles ne parviennent pas à éliminer la tumeur.

Une deuxième explication à l'absence de contrôle peut être la mise en place d'un processus d'épuisement. Ceci a été montré dans différents modèles de tumeurs solides : RMA-S, TC-1, 4T1. (Ardolino et al., 2014a; Ohs et al., 2017a; Seo et al., 2017a) comme nous l'avons vu en introduction. C'est pourquoi nous avons ensuite analysé la fonctionnalité des cellules NK infiltrant les tumeurs RMA-KR en comparaison des tumeurs RMA. Comme contrôle, nous avons utilisé les cellules NK spléniques des animaux porteurs de tumeur. Nos résultats montrent que les cellules NK infiltrant les tumeurs RMA ou RMA KR sont peu répondeuses comparées aux cellules NK de la rate du même animal (Figure 38). Ces données sont à prendre avec précaution car elles sont issues d'une seule expérience. Par ailleurs, dans cette expérience, nous avons purifié les cellules NK par la technologie MACS, cependant nous n'avons pu obtenir qu'une pureté de 1,5%, nous n'avons donc pas réussi à éliminer les cellules tumorales qui sont donc présentes dans le puits de culture contenant l'anticorps NK1.1 et peuvent durant les 4 heures de coculture épuiser le milieu en nutriment et empêcher les cellules NK de répondre, ce qui pourraient



**Figure 39: Fonctionnalité des cellules NK aux stades terminaux**

$5 \times 10^7$  RMA ou RMA-KR ont été injectées dans des souris C57BL/6 de 8 semaines, aux stades terminaux (Jour 8/9 pour les RMA ou J12/J13/14 pour les RMA-KR), les souris ont été sacrifiées et la rate a été prélevée. Les splénocytes ont ensuite été comptés puis restimulés avec un anticorps anti NK1.1 à  $10 \mu\text{g/mL}$  pendant 4h de culture. Le pourcentage de cellules NK positives pour CD107a et IFN- $\gamma$  a été analysé par cytométrie de flux et corrélé au nombre de cellules tumorales ZsGreen<sup>+</sup> présentes dans la rate. \*\*\*\*p-value < 0,0001, n.s : non significatif. L'analyse statistique a été réalisée par utilisation du test de Student de comparaison de données non appariées. Les résultats incluent 4 expériences indépendantes comprenant chacune entre 3 et 4 souris par groupe.



**Figure 40: Analyse de la fonctionnalité des cellules NK en fonction du nombre de cellules tumorales**

$5 \times 10^7$  de cellules RMA ou RMA-KR ont été injectées par voie intraveineuse à des souris C57BL/6 de 8 semaines. Les souris ont été sacrifiées à différents temps (J2, J4, J7, J8, J9, J11, J12, J13 et J14) et la rate a été prélevée. Les splénocytes ont ensuite été restimulés avec un anticorps anti NK1.1 à  $10 \mu\text{g/mL}$  pendant 4h de culture. Le pourcentage de cellules NK positives pour IFN- $\gamma$  (A) et CD107a (B) a été analysé par cytométrie en flux et corrélé au nombre de cellules tumorales ZsGreen<sup>+</sup> présentes dans la rate. \*\*\*\*p-value < 0,0001, n.s : non significatif. L'analyse statistique a été réalisée par utilisation du test de Student de comparaison de données non appariées. Les résultats incluent 4 expériences indépendantes comprenant chacune entre 3 et 4 souris par groupe.

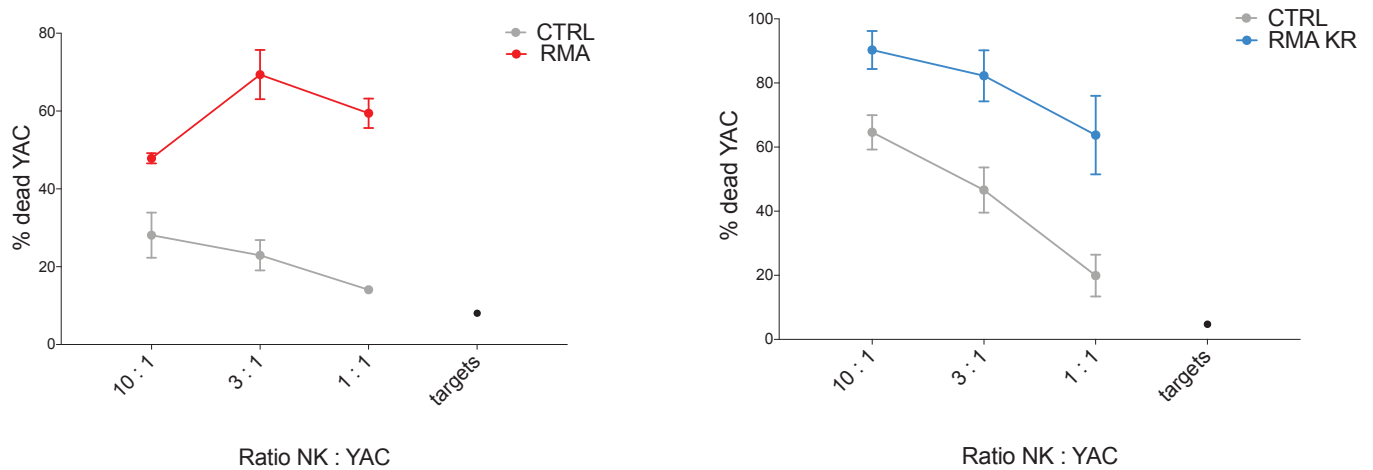
expliquer pourquoi nous avons une baisse de fonction pour les cellules NK de souris RMA.

## **2.2 Étude des mécanismes impliqués dans la perte de fonction des cellules NK**

### **2.2.1 Le contrôle exercé par les cellules NK devient progressivement inefficace**

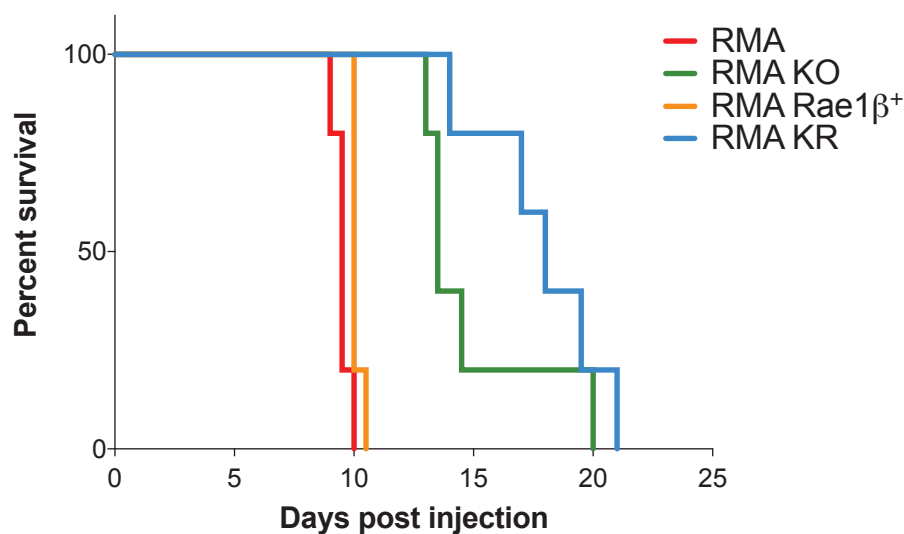
Dans le modèle d'injection par voie intraveineuse, le contrôle des RMA-KR par les cellules NK devient progressivement inefficace et les cellules tumorales finissent par pousser. Ceci est associé à un état d'hypo-réponse. En effet, aux stades terminaux les cellules NK spléniques des souris RMA-KR ont une fonctionnalité limitée (Figure 39) comparées aux cellules NK des souris RMA qui répondent d'une manière similaire aux cellules NK de souris contrôles. Les cellules NK des souris RMA constituent donc un bon contrôle pour la suite des expériences visant à caractériser l'épuisement qui survient en cas de stimulation chronique par les cibles RMA-KR. En effet, dans les deux conditions, les cellules NK sont soumises à un environnement tumoral et à une forte inflammation mais seules les cellules NK de souris RMA-KR sont stimulées directement par les cellules tumorales. La production d'IFN- $\gamma$  est la fonction la plus touchée (Figure 40A). Bien que l'on observe une tendance à la diminution concernant la dégranulation en présence d'un nombre important de cellules tumorales dans la rate, supérieur à 1 million (>1M), cette différence n'est pas significative (Figure 40B).

Bien que la dégranulation (expression de CD107a à la surface) ne semble pas affectée après restimulation par un anti NK1.1, nous avons tout de même testé la capacité des cellules NK à lyser des cibles *ex vivo* (fonction de cytotoxicité). Les cellules NK issues de souris RMA ou RMA KR aux stades terminaux ont été purifiées et co-cultivées avec des cibles YAC-1 pendant 4h et le pourcentage de lyse a été analysé (Figure 41). Les cellules NK de souris RMA KR tuent plus de cibles que les cellules NK contrôles. Cette différence est également valable pour les cellules NK de souris RMA.



**Figure 41: Analyse de la cytotoxicité des cellules NK ex vivo**

$5 \times 10^7$  de cellules RMA ou RMA-KR ont été injectées par voie intraveineuse à des souris C57BL/6 de 8 semaines. Les souris ont été sacrifiées aux stades terminaux (J9 pour les RMA et J13 pour les RMA KR). Les cellules NK ont ensuite été purifiées et co-cultivées avec des cellules YAC-1 préalablement marquées au CTV, aux différents ratios indiqués pendant 4h. Le pourcentage de lyse de cellules YAC-1 a été analysé par cytométrie en flux par marquage 7AAD. L'expérience a été réalisée une fois et incluait 3 souris par groupe.



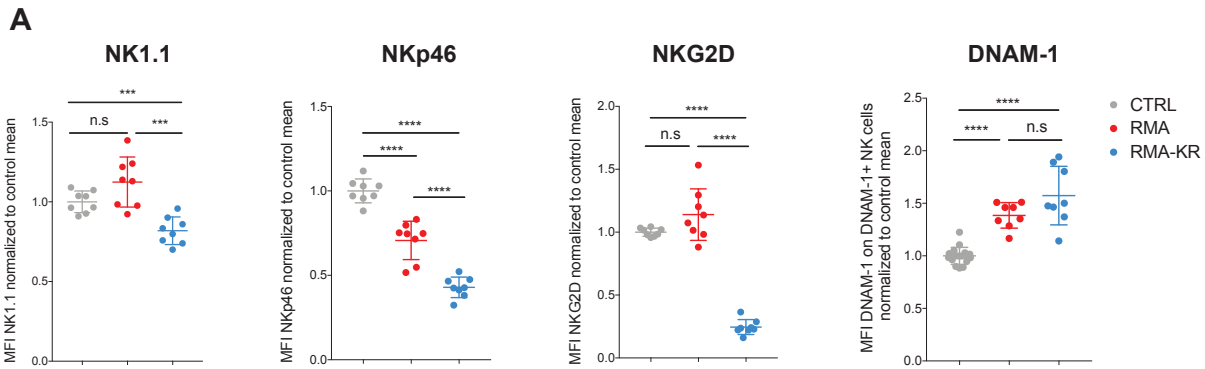
**Figure 42: Survie des souris après injection des 4 lignées**

$5 \times 10^6$  de cellules RMA, RMA-KO, RMA-Rae1- $\beta^+$  ou RMA-KR ont été injectées par voie intraveineuse dans des souris C57BL/6 de 8 semaines. Les courbes de survie sont présentées et ont été analysées par la méthode de Kaplan-Meier et le test statistique Log-Rank (Mantel-Cox). Cette expérience a été réalisée une seule fois et incluait 5 souris par groupe.

Afin de comprendre si les deux signaux « soi induit » (Rae1- $\beta$ ) et « soi absent » (absence de CMH-I) sont impliqués dans la perte de fonction ou si l'un ou l'autre est plus puissant, nous avons utilisé les quatre lignées générées. Les expériences de survie montrent que le contrôle de la tumeur est essentiellement permis par le signal du soi manquant (Figure 42). En effet, les souris injectées avec les RMA KO montrent un délai dans la pousse même si ce délai est plus important avec les RMA KR. En revanche, les souris injectées avec les RMA Rae1- $\beta$  meurent très rapidement comme celles injectées avec les RMA.

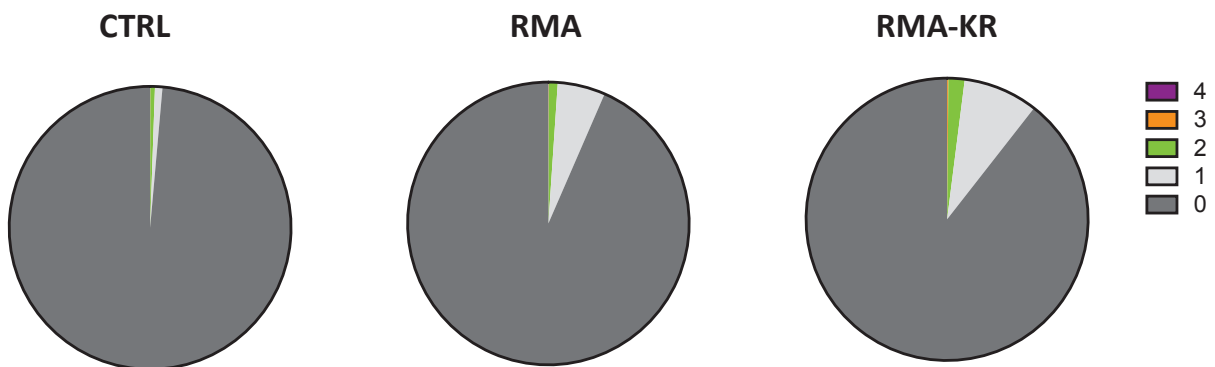
Pour déterminer l'impact sur la fonctionnalité d'une stimulation chronique avec ces différentes cibles, nous analyserons la fonction après re-stimulation *ex vivo* des cellules NK de souris injectées avec chacune des 4 lignées. Ces tests seront réalisés par la suite.





**Figure 43: Expression des NKaR**

$5 \times 10^7$  RMA ou RMA-KR ont été injectées dans des souris C57BL/6 de 8 semaines, aux stades terminaux (Jour 8/9 pour les RMA ou J12/J13 pour les RMA-KR), les souris ont été sacrifiées et la rate a été prélevée. Les splénocytes ont ensuite été comptés puis l'expression des récepteurs NKaR indiqués a été mesurée par cytométrie de flux. Les variations de moyennes d'intensité de fluorescence (MFI) sont présentées pour les NK de souris RMA-KR en comparaison avec les RMA et ont été normalisée par rapport à la moyenne des MFI pour les cellules NK contrôles. Pour DNAM-1, le graphique représente la MFI des cellules positives pour DNAM-1. L'analyse statistique a été réalisée par utilisation du test de Student de comparaison de données non appariées. \*\*\*\* p-value <0,0001, n.s : non significatif. Cette expérience incluait 8 souris par groupe et a été réalisée au moins deux fois pour chaque marqueur.



**Figure 44: Expression combinée des ICP**

$5 \times 10^7$  RMA ou RMA-KR ont été injectées dans des souris C57BL/6 de 8 semaines, aux stades terminaux (Jour 9 pour les RMA ou J13 pour les RMA-KR), les souris ont été sacrifiées et la rate a été prélevée. Les splénocytes ont ensuite été comptés puis l'expression des ICP Tim-3, TIGIT, PD-1 et Lag3 a été mesurée par cytométrie de flux. Une analyse en booléen a ensuite été réalisée via l'utilisation d'un plug-in sur Flow Jo 10. Cette expérience inclue 4 souris par groupe et a été réalisée 1 fois.

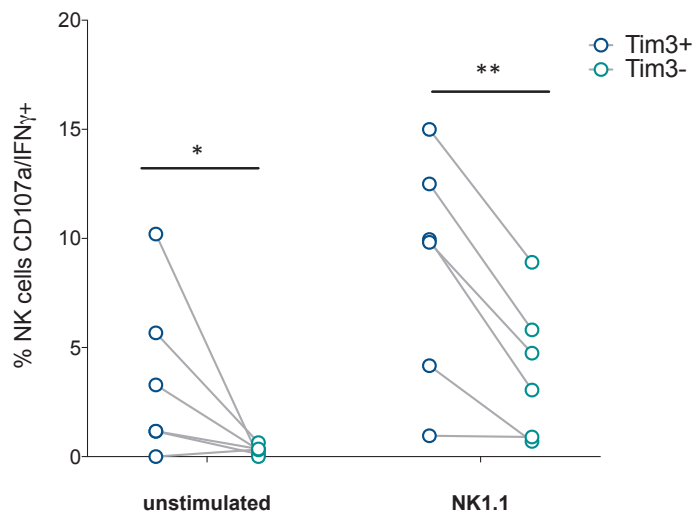
## 2.2.2 Caractéristiques phénotypiques des cellules NK dans le modèle RMA-KR

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, une des caractéristiques des cellules NK dysfonctionnelles est la baisse d'expression des NKaR et l'augmentation des NKiR. Nous avons donc cherché à déterminer si cette propriété est vérifiée dans notre modèle.

Les cellules NK de souris porteuses de tumeur RMA ou RMA-KR ont été analysées pour l'expression des NKaR NKG2D, NK1.1, NKp46, DNAM-1 (Figure 43). On observe une perte d'expression de ces NKaR à l'exception de DNAM-1 dont l'expression est augmentée dans les deux conditions (RMA et RMA-KR). DNAM-1 reste exprimé par environ 50% des cellules NK (données non montrées) et c'est son expression sur les cellules NK DNAM-1 positives qui augmente.

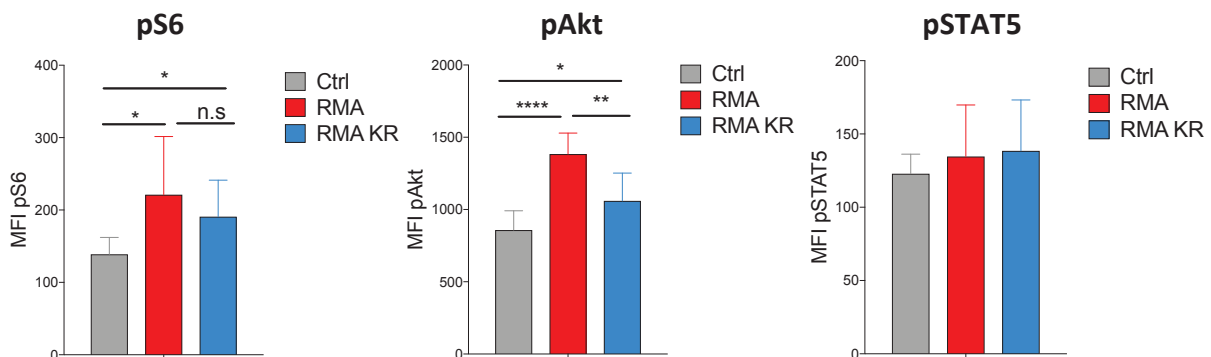
Une augmentation de l'expression des NKiR est également une marque du processus d'épuisement. Le pourcentage de cellules NK exprimant KLRG1 et NKG2A a donc été analysé dans les deux modèles mais n'est pas modifié (données non montrées).

Enfin, comme nous l'avons rapporté dans l'article 1, certains ICP (Tim-3, TIGIT, PD-1 et Lag-3) peuvent être induits à la surface des cellules NK, le plus fortement exprimé étant Tim-3. Nous avons ensuite souhaité déterminer si ces ICP sont exprimés par les mêmes cellules. Pour cela une analyse de la combinatoire d'expression de ces quatre ICP a permis d'établir le nombre d'ICP exprimé par cellule (Figure 44). Dans cette expérience, 88% des cellules NK issues de souris RMA-KR n'expriment pas d'ICP. Seul 10% expriment 1 ICP et 2% en expriment 2. De même pour les RMA, 94% des cellules n'en expriment pas alors que 5% et 1% en expriment respectivement 1 et 2. Pour ces marquages, nous avons testé plusieurs anticorps et n'avons utilisé que ceux « validés » notamment par analyse sur les LT. Il est important de noter que les résultats varient suivant le fluorochrome utilisé.



**Figure 45: Fonctionnalité dans les cellules NK Tim3+ comparées aux Tim3-**

$5 \times 10^7$  RMA-KR ont été injectées dans des souris C57BL/6 de 8 semaines. Au stade terminal (Jour 13), les souris ont été sacrifiées et la rate a été prélevée. Les splénocytes ont ensuite été restimulés avec un anticorps anti NK1.1 à  $10 \mu\text{g/mL}$  pendant 4h de culture. Le pourcentage de cellules NK positives pour Tim-3, CD107a (B) et IFN- $\gamma$  (C) a été analysé par cytométrie de flux et les résultats présentent le pourcentage de cellules doubles positives (CD107a<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>) parmi les cellules NK Tim3<sup>+</sup> ou Tim3<sup>-</sup> stimulées ou non. Les cellules du même animal sont reliées par une ligne. L'analyse statistique a été réalisée par utilisation du test de Student de comparaison de données appariées. \*\* p-value <0,01, n.s : non significatif. Cette expérience incluait 5 souris par groupe et a été réalisée 2 fois.



**Figure 46: Activation de la voie mTOR**

$5 \times 10^7$  RMA ou RMA-KR ont été injectées dans des souris C57BL/6 de 8 semaines, aux stades terminaux (Jour 8/9 pour les RMA ou J12/J13 pour les RMA-KR), les souris ont été sacrifiées et la rate a été prélevée. L'analyse de pS6, pAkt et pSTAT5 a ensuite été réalisée par cytométrie de flux. Les MFI de pS6, pAkt et pSTAT5 à l'état basal sont indiquées. L'analyse statistique a été réalisée par utilisation du test de Student de comparaison de données appariées. \*\*\*\* p-value <0,0001, \*\*p-value < 0,01 et \*p-value <0,05 n.s : non significatif. Cette expérience incluait 8 souris par groupe et a été réalisée 2 fois

## 2.2.3 Causes intrinsèques de la perte de fonction

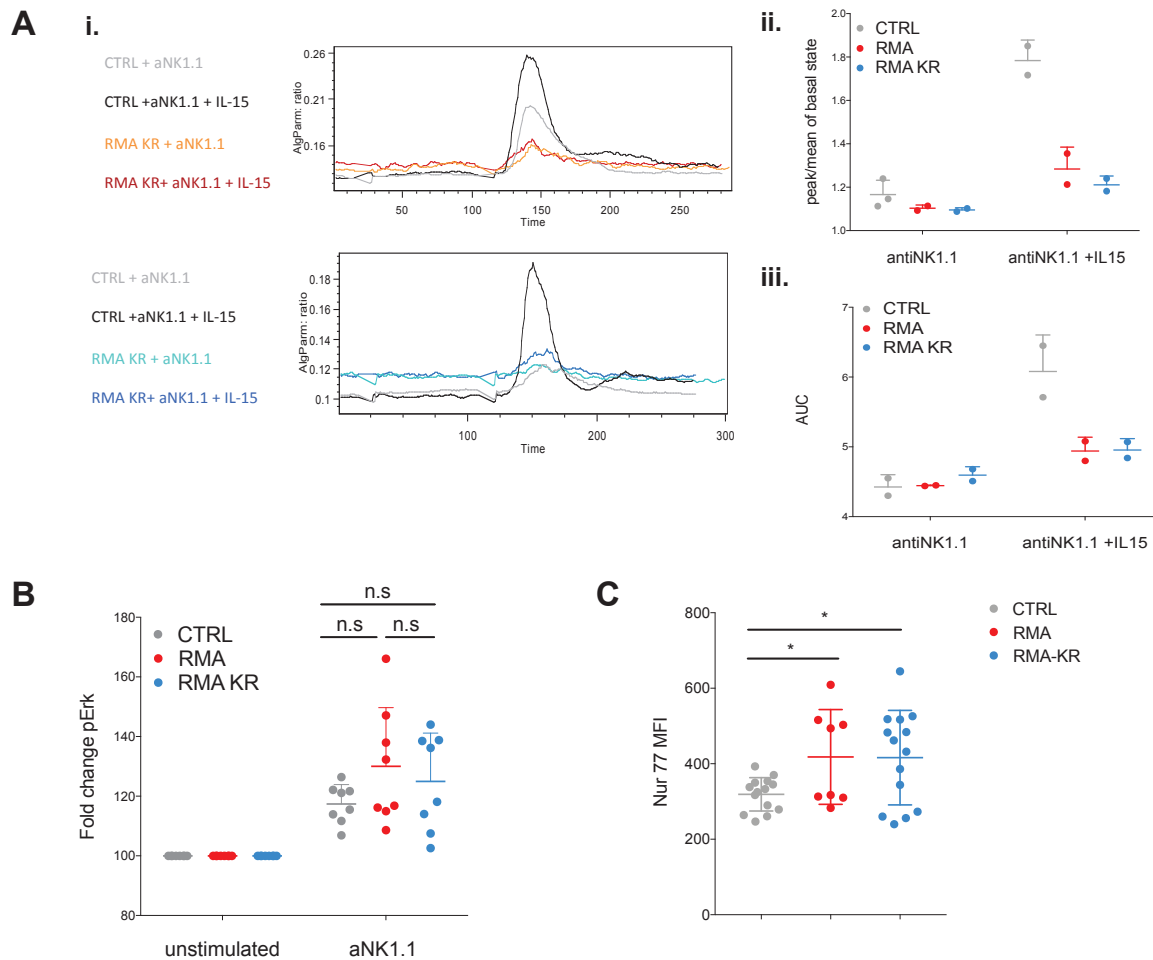
### a) Approche basée sur des hypothèses :

Tout d'abord, nous avons vu que les cellules NK de souris RMA-KR expriment l'ICP Tim-3 et relativement peu de PD-1, TIGIT et Lag-3. Nous avons donc comparé la fonctionnalité des cellules NK Tim-3<sup>+</sup> et Tim-3<sup>-</sup>. Les résultats présentés sur la **Figure 45** montrent que les cellules NK exprimant Tim-3 ont un plus fort niveau d'activation avant comme après re-stimulation. Ces cellules semblent donc être les plus actives. L'induction d'ICP n'apparaît donc pas ici comme un régulateur majeur de la fonctionnalité des cellules NK.

Par la suite, nous avons exploré d'autres voies de signalisation pouvant être à l'origine de cette perte de fonction. Dans ces expériences, il est important de prendre en compte la charge tumorale présente dans la rate au moment de l'expérience afin de pouvoir comparer correctement les cellules NK issues de souris RMA-KR avec celles de souris RMA. Ce paramètre est important, puisque, comme nous l'avons vu précédemment, les défauts fonctionnels observés dans les cellules NK de souris RMA-KR interviennent pour des charges tumorales plus élevées.

Comme nous l'avons montré dans l'article 1, l'activation de la voie mTOR (analysée via la phosphorylation de S6 et Akt) après stimulation avec de l'IL-15 *ex vivo* est beaucoup plus faible dans les cellules NK de souris RMA-KR. En revanche, le niveau basal d'activation est plus élevé dans les souris porteuses de tumeur que dans les cellules NK de souris sans tumeur (**Figure 46**). Dans ces expériences le pourcentage de cellules tumorales était important à la fois pour les conditions RMA (12 ; 17,4 ; 16,6 ; 14 ; 14,5 ; 17,4 ; 16 et 16,3 %) et RMA KR (31 ; 24,8 ; 21,8 ; 5,01 ; 36,8 ; 30,1 ; 16,8 et 15,7 %).

La signalisation en aval des NKaR a également été étudiée par différents moyens. Tout d'abord, nous avons mesuré le flux calcique après stimulation avec un anti NK1.1 afin de déterminer si des altérations peuvent être observées dans les signaux précoces (**Figure 47A**). Le ratio pic/ligne de base (ii) et l'aire sous la courbe calculée (iii) semblent suggérer que le flux calcique en réponse à une stimulation anti NK1.1/IL-15 est diminué dans les cellules NK de souris porteuses de tumeurs.



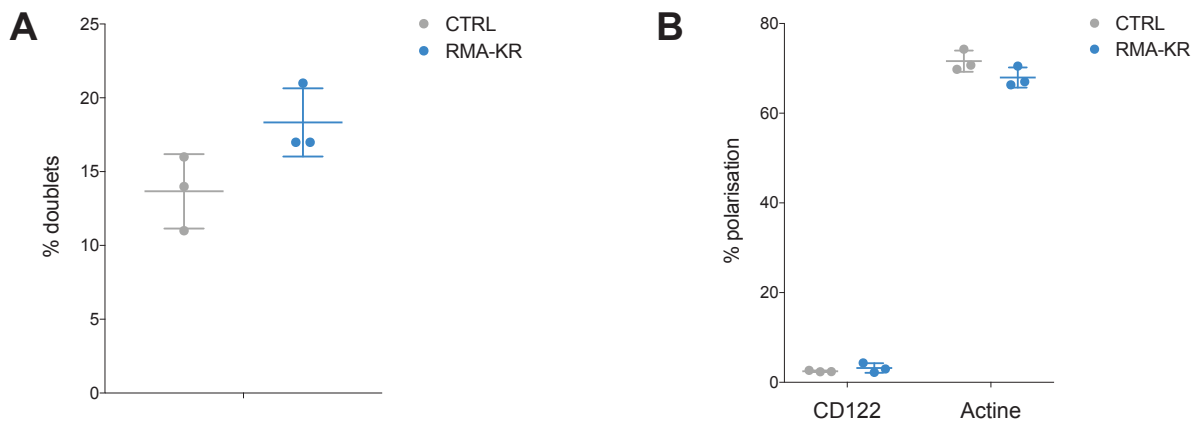
**Figure 47: Signalisation en aval des NKaR**

$5 \times 10^7$  RMA ou RMA-KR ont été injectées dans des souris C57BL/6 de 8 semaines, aux stades terminaux (Jour 8 pour les RMA ou J13 pour les RMA-KR), les souris ont été sacrifiées et la rate a été prélevée. Le flux calcique a été mesuré pendant 3 minutes après stimulation par l'anticorps NK1.1 via l'utilisation de la sonde Indo1 en présence ou non d'IL-15 (A). Les données ont été analysées par cytométrie de flux et les courbes obtenues sont présentées (i). Le ratio pic/basal a été calculé (ii) ainsi que l'aire sous la courbe (AUC) (iii). Cette expérience incluait 2 souris par groupe et a été réalisée une seule fois. Les splénocytes ont également été stimulés par un anticorps anti NK1.1 soluble pendant 1 min et la phosphorylation de Erk a été mesurée par cytométrie de flux (B). Les splénocytes ont ensuite été analysés pour l'expression basale de Nur77 par cytométrie de flux (C). Les MFI sont indiquées sur le graphe. L'analyse statistique a été réalisée par utilisation du test de Student de comparaison de données appariées. Cette expérience incluait 8 souris pour le groupe RMA et 14 pour les groupes RMA-KR et contrôles. Les données sont présentées sous la forme de variations entre la condition non stimulée et stimulée (fold change). L'analyse statistique a été réalisée par utilisation du test de Student de comparaison de données appariées. Cette expérience incluait 8 souris par groupe et a été réalisée 2 fois. p-value <0,05 n.s : non significatif.

Il n'existe cependant pas de différence significative entre les cellules NK de souris RMA-KR et RMA. En revanche, les cellules NK issues de souris porteuses de tumeur sont toujours capables d'induire un flux calcique en réponse à une stimulation NK1.1. Elles perdent donc la capacité à répondre à l'IL-15 comparées aux cellules NK de souris contrôles. Ce sont des données préliminaires obtenues à partir de deux échantillons par condition et les pourcentages de cellules tumorales étaient inférieurs à 0,5% pour les RMA KR contrairement aux RMA pour qui nous avons mesuré des pourcentages de l'ordre de 2 à 5%. Les statistiques ne peuvent donc pas être calculés et l'expérience va être répétée afin d'augmenter le nombre d'échantillons testés. De plus, nous avons mesuré la phosphorylation de la protéine Erk appartenant à la voie des MAP Kinases, qui est un autre témoin de l'activation sous les NKaR (Figure 47B). Cette mesure a été réalisée à l'état basal et suite à une stimulation avec un anti NK1.1 pendant 1h. Les cellules NK de souris RMA et RMA-KR répondent de la même manière que les cellules NK de souris contrôles. Les souris présentaient ici des pourcentages de cellules tumorales élevés dans la rate (cf les mêmes pourcentages que pour la Figure 46). Enfin, nous avons analysé l'expression de Nur77 dans les cellules stimulées chroniquement par les cibles (condition RMA-KR) (Figure 47C). Ce marqueur est augmenté dans les cellules NK de souris porteuses de tumeurs soulignant l'état d'activation de ces cellules. Cependant, son expression ne diffère pas entre les RMA et les RMA-KR. La charge tumorale ici était élevée dans les deux conditions (cf les mêmes pourcentages que pour la Figure 46).

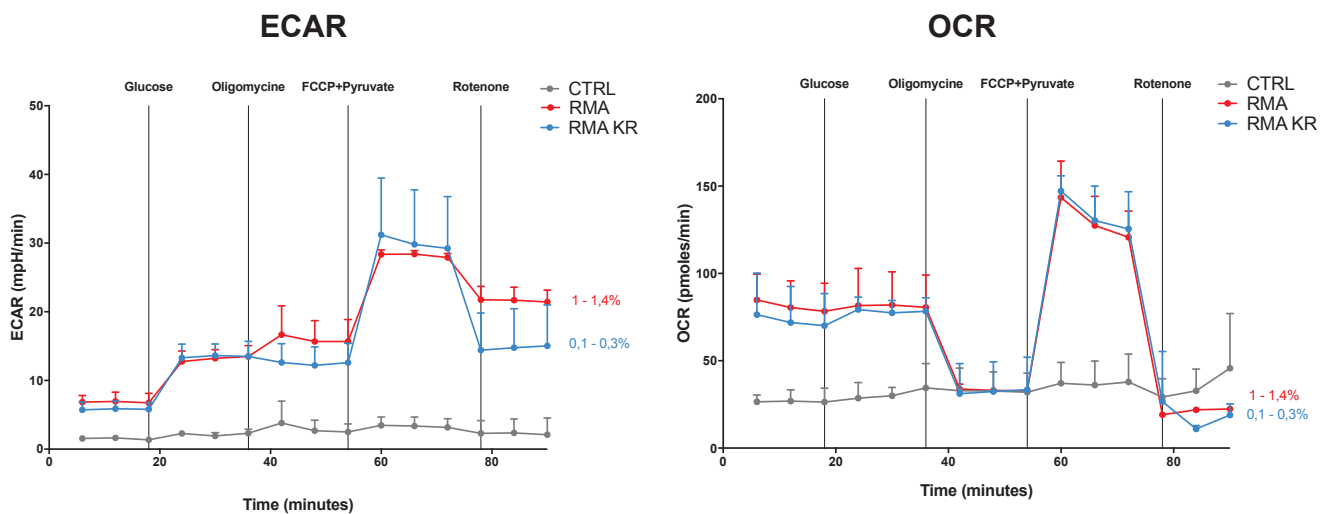
Ainsi, bien que les cellules NK de souris RMA-KR soient chroniquement stimulées via l'engagement de NKG2D et l'absence de signal inhibiteur, la mesure de l'expression de Nur77 ne permet pas de détecter d'augmentation dans la signalisation en aval des NKaR en condition basale. Le but est maintenant de tester l'expression de Nur77 après une stimulation *ex vivo* des NKaR afin d'examiner si les cellules NK de RMA-KR présentent des défauts de signalisation.

Globalement, le niveau d'activité de mTOR est plus élevé de base dans les cellules NK de souris porteuses de tumeur mais la signalisation en aval des NKaR ne semble pas être affectée.



**Figure 48: Formation de conjugués entre les cellules NK et les cellules YAC**

$5 \times 10^7$  RMA ou RMA-KR ont été injectées dans des souris C57BL/6 de 8 semaines, aux stades terminaux (Jour 8/9 pour les RMA ou J12/J13 pour les RMA-KR), les souris ont été sacrifiées et la rate a été prélevée. Les cellules NK ont ensuite été purifiées puis co-cultivées avec des cellules YAC préalablement marquées au CTV à un ratio 1:1 durant 20 min. Les cellules ont ensuite été récupérées, lavées et marquées puis analysées par ImageStream X. Le pourcentage de doublets formés est présenté (A) ainsi que le pourcentage de cellules présentant une polarisation de l'actine ou de CD122 (B). Les différences ne sont pas significatives d'après le test de Student comparant des données non appariées. Ces résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes qui incluaient 3 souris par groupe.



**Figure 49: Analyse des voies de la glycolyse et de l'OXPPOS**

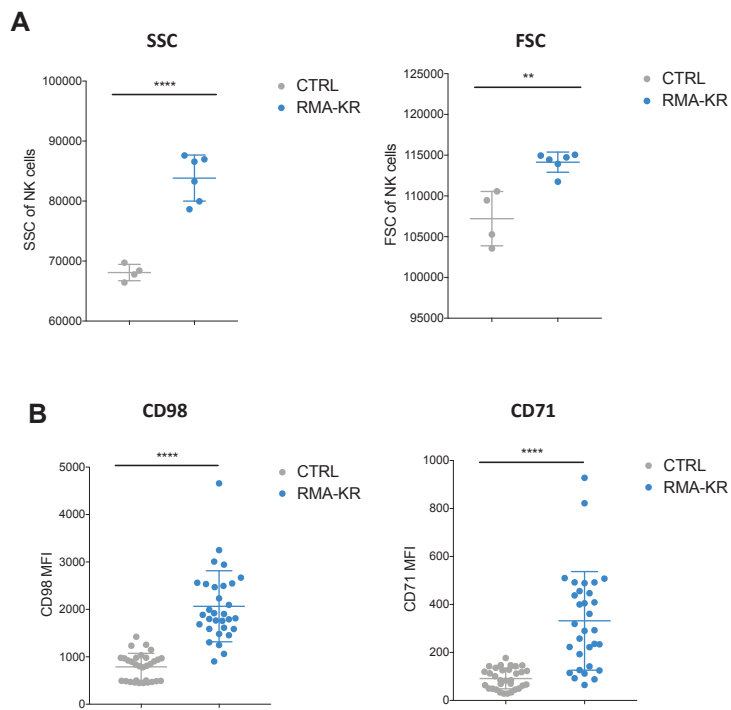
$5 \times 10^7$  RMA ou RMA-KR ont été injectées dans des souris C57BL/6 de 8 semaines, aux stades terminaux (Jour 8/9 pour les RMA ou J12/J13 pour les RMA-KR), les souris ont été sacrifiées et la rate a été prélevée. Les cellules NK ont ensuite été purifiées puis triées et le métabolisme a été analysé par SeaHorse. La glycolyse (ECAR pour Extracellular Acidification Rate) et l'OXPPOS (OCR pour Oxygen Consumption Rate) ont été mesurées en temps réel après injection de glucose (25 mM), d'oligomycine (1 $\mu$ M), de FCCP (1,5 $\mu$ M) + Pyruvate (1mM) et d'antimycine A (1 $\mu$ M) + Rotenone (0,1 $\mu$ M) comme indiqué. Les courbes représentent la moyenne de trois souris et sont représentatives de trois expériences indépendantes.

Nous avons ensuite voulu comparer la formation de la synapse et c'est pourquoi nous avons ensuite analysé par ImageStream X, le pourcentage de doublets formés entre les cellules NK de souris RMA-KR et des cibles YAC-1 co-cultivées *in vitro* pendant 20 min (Figure 48A). Les données ont été comparées à celles obtenues à partir de cellules NK contrôles. Les cellules NK de souris RMA-KR semblent toujours capables de former des conjugués avec des cibles potentielles comme c'est le cas pour les cellules NK de souris contrôles. Dans ces conditions nous avons également mesuré la polarisation de l'actine au niveau de la synapse formée entre les deux types cellulaires (Figure 48B). Le pourcentage de cellules NK pour lesquelles il existe une polarisation de l'actine comparée à la répartition d'un récepteur non polarisé CD122 est représenté. Aucune différence entre les conditions contrôle et RMA-KR n'a été observée. Les cellules NK de souris RMA-KR parviennent donc à former une synapse stable avec leurs cibles. Cependant, ces résultats sont à prendre avec précaution car le pourcentage de cellules tumorales était faible (<0,1%).

Enfin, les données de la bibliographie suggèrent que de profonds défauts métaboliques surviennent dans les cellules épuisées LT ou NK et peuvent être à l'origine de dérégulations fonctionnelles. Afin de déterminer, si de telles altérations surviennent dans les cellules NK du modèle RMA-KR, nous avons utilisé l'appareil Seahorse afin de mesurer les niveaux de glycolyse (ECAR pour extracellular acidification rate) et d'OXPPOS (OCR pour oxygen consumption rate) dans des cellules NK de souris contrôles, RMA ou RMA-KR (Figure 49). Globalement, les cellules NK de souris porteuses de tumeur ont un métabolisme plus actif que celui de cellules NK naïves. Aucune différence n'a été observée entre les conditions RMA et RMA-KR. Dans la condition RMA-KR, même en présence d'un faible pourcentage de cellules tumorales dans la rate (<0,3%), les cellules NK ont un métabolisme hyperactif comparable à celui de la condition RMA où la tumeur est déjà présente en forte quantité (>1%). Malheureusement, nous n'avons pas pu comparer les taux de glycolyse et d'OXPPOS à charge tumorale égale.

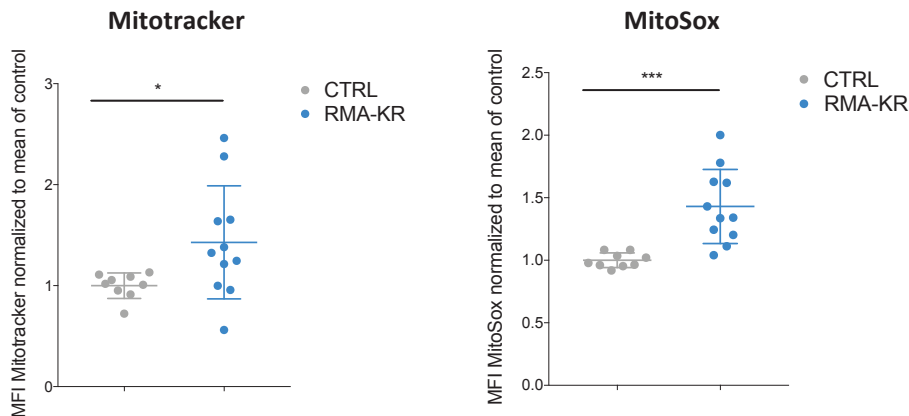
D'autres paramètres corrélés au métabolisme ont été mesurés dans les cellules NK de souris RMA-KR par différentes mesures. Tout d'abord, la taille et la granulosité des cellules ont été évaluées au stade terminal, en présence d'une charge tumorale élevée. L'augmentation de ces deux paramètres trahit la plus forte activité





**Figure 50: Analyse de marqueurs métaboliques**

$5 \times 10^7$  RMA-KR ont été injectées dans des souris C57BL/6 de 8 semaines, aux stades terminaux (J12/J13), les souris ont été sacrifiées et la rate a été prélevée. Les cellules NK au sein des splénocytes ont ensuite été analysées par cytométrie de flux pour la taille/structure (SSC/FSC) (A) et l'expression de CD98 et de CD71 (B). L'analyse statistique a été réalisée par utilisation du test de Student de comparaison de données appariées. Cette expérience représente les données issues de 3 tests qui incluaient au moins 4 souris par groupe. \*\*\*\* p-value < 0,0001 et \*\* p-value < 0,01



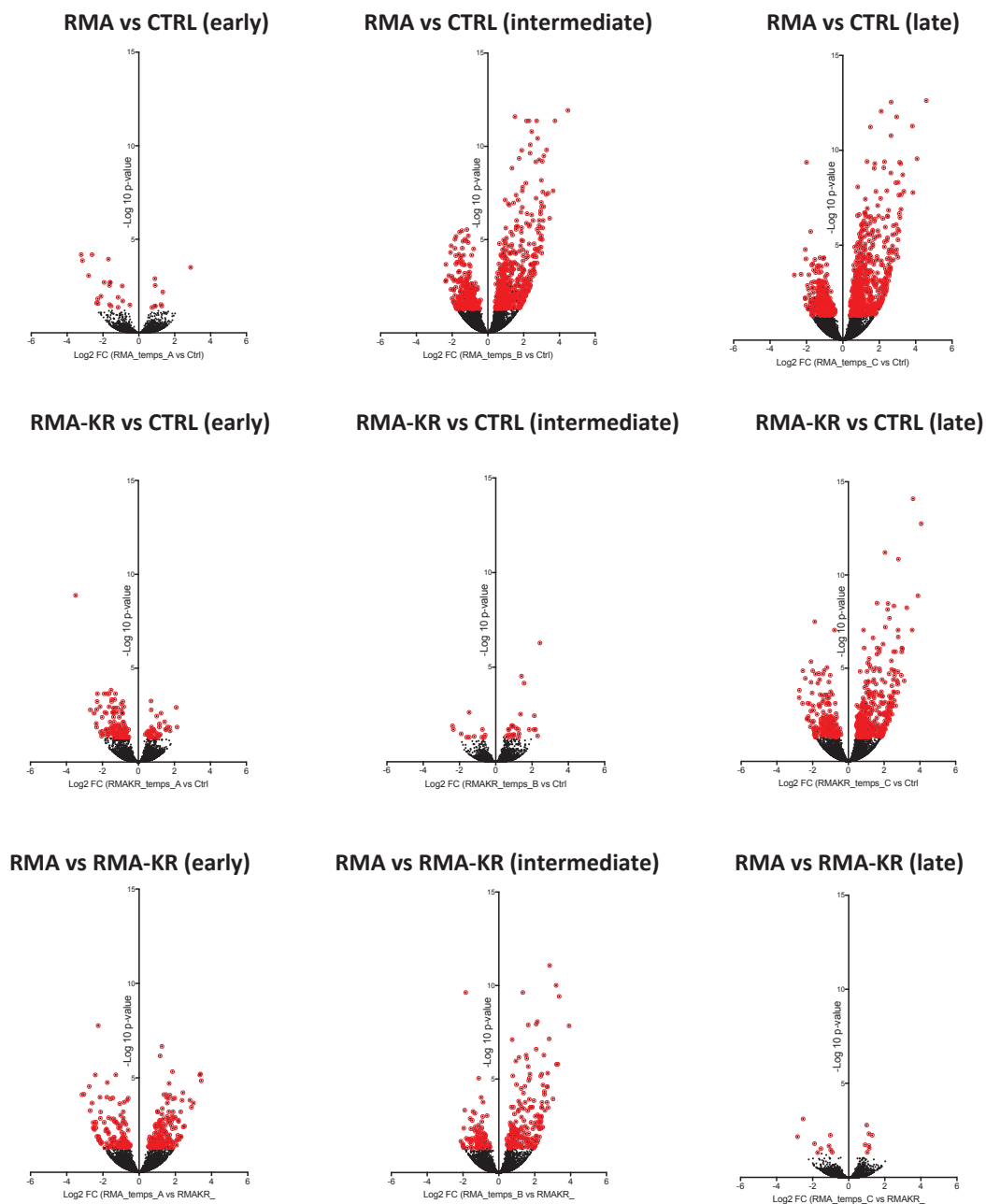
**Figure 51: Analyse de l'état des mitochondries**

$5 \times 10^7$  RMA-KR ont été injectées dans des souris C57BL/6 de 8 semaines, aux stades terminaux (J12/J13) les souris ont été sacrifiées et la rate a été prélevée. Les splénocytes ont ensuite été incubés en présence des sondes Mitotracker Green ( $1 \mu\text{M}$ ) (gauche) et MitoSOX Red ( $5 \mu\text{M}$ ) (droite) et analysés par cytométrie de flux. Les données ont été normalisées par rapport à la moyenne des contrôles et analysées par utilisation du test de Student de comparaison de données appariées. Cette expérience représente les données issues de 2 tests qui incluaient au moins 3 souris par groupe. \*\*\* p-value < 0,001 et \* p-value < 0,05.

métabolique des cellules NK de souris RMA-KR (Figure 50A). L'expression du récepteur de la transferrine (CD71) et d'un transporteur d'acides aminés (CD98) sont également des témoins de l'activité métabolique et de l'activité de la voie mTOR. Ces deux marqueurs sont augmentés à la surface des cellules NK du modèle RMA-KR comparés aux cellules NK contrôles (Figure 50B). Enfin, nous avons analysé les mitochondries d'un point de vue qualitatif et quantitatif via l'utilisation de deux sondes fluorescentes Mitotracker et MitoSox (Figure 51). Ici, nos résultats montrent que, dans la condition RMA-KR, la masse mitochondriale est plus élevée. De plus, les mitochondries semblent plus actives et produisent plus de ROS ce qui peut être délétère pour la cellule. Dans ces dernières expériences, le pourcentage de tumeur était supérieur à 1 million (1M). L'ensemble de ces expériences montre qu'en contexte de stimulation chronique, les cellules NK augmentent leur activité métabolique par rapport à des cellules NK au repos. Ces expériences doivent maintenant être réalisées dans la condition RMA afin de tester si l'environnement tumoral en lui-même induit de tels changements métaboliques.

#### b) Approche non biaisée : définition du profil transcriptionnel

Afin d'explorer les différentes voies moléculaires dans les cellules NK épuisées, de façon non biaisée, nous avons utilisé la technique de RNA Seq. Cette analyse a permis d'établir le profil transcriptionnel des cellules NK en contexte de stimulation chronique. Nous avons purifié les cellules NK de la rate de souris contrôles, de souris RMA et de souris RMA-KR, à différents stades : précoce (Jour 2), intermédiaire (Jour 4 pour les RMA et Jour 7 pour les RMA-KR) et tardif (Jour 9 pour les RMA et Jour 11 pour les RMA-KR). Les « Volcano plots » permettant de comparer l'expression différentielle des gènes à chaque temps entre les différentes conditions mettent en évidence plusieurs points (Figure 52). Tout d'abord, au temps précoce, on retrouve plus de gènes dont l'expression est diminuée par rapport au contrôle à la fois pour la condition RMA et pour la condition RMA-KR. La majorité des changements transcriptionnels se produit à partir du temps intermédiaire pour les RMA alors qu'elle ne survient qu'au stade tardif pour les RMA-KR lorsque l'on compare au contrôle. Ce qui correspond au moment où la tumeur apparaît. Enfin, les cellules NK de souris RMA-KR présentent un profil très différent de celui des RMA



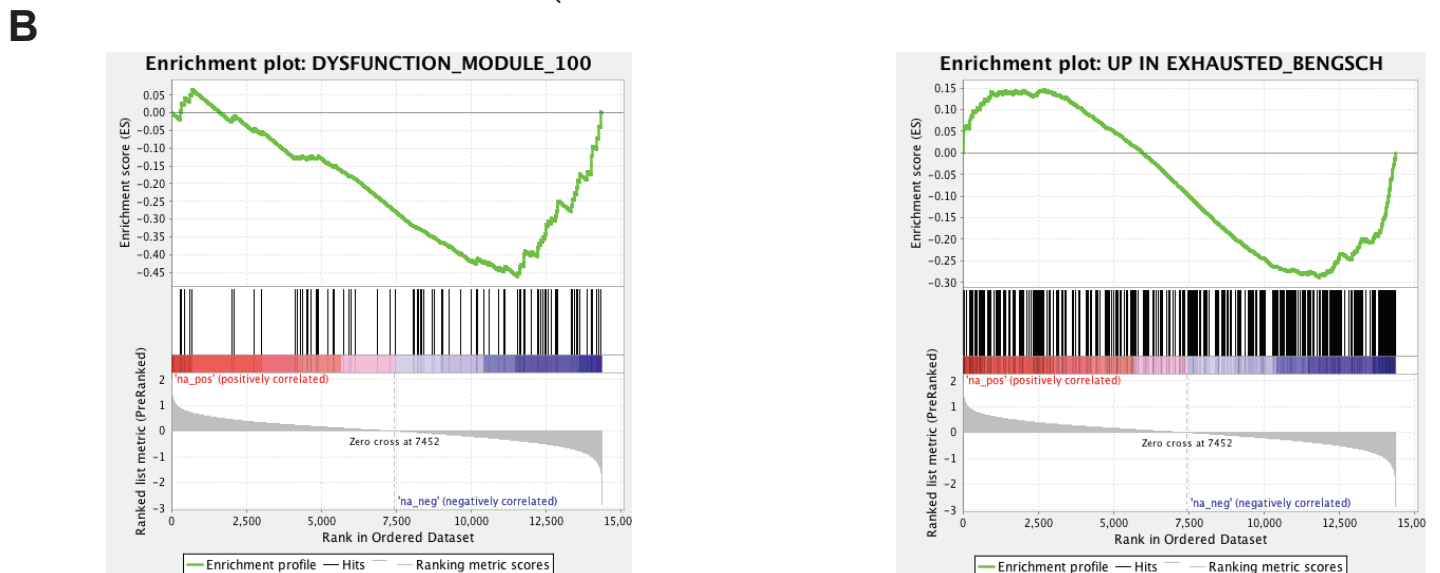
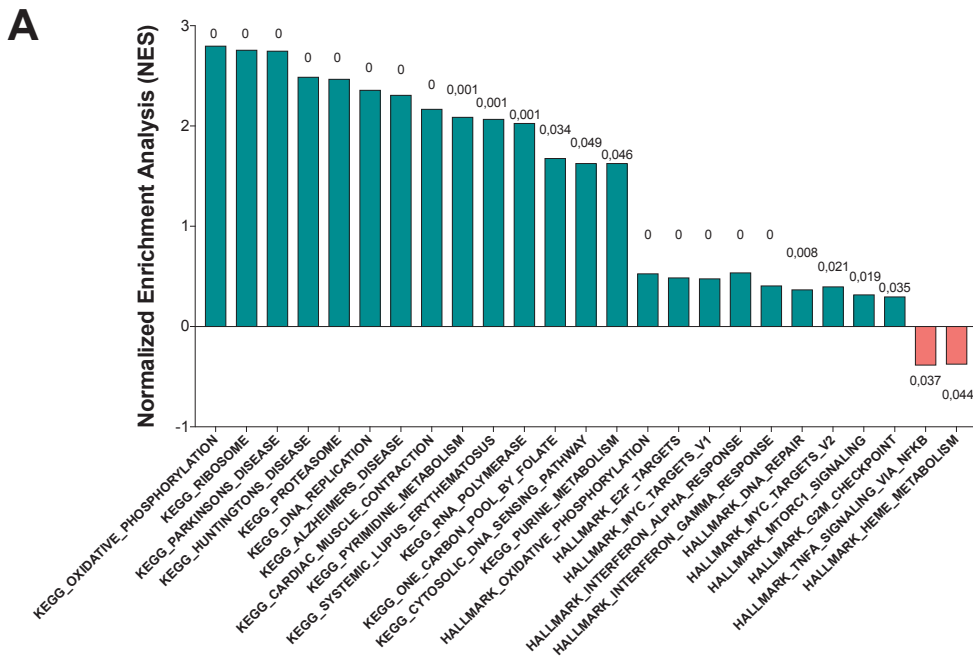
**Figure 52: Analyse du profil transcriptionnel au cours du temps**

$5 \times 10^7$  RMA ou RMA-KR ont été injectées dans des souris C57BL/6 de 8 semaines. Les souris ont été sacrifiées à différents temps (précoce (early) = J2, intermédiaire (intermediate) = J4 pour les RMA et J7 pour les RMA-KR, et tardifs (late) = J9 pour les RMA et J14 pour les RMA-KR). La rate a été prélevée et les cellules NK purifiées puis triées sur l'expression de NK1.1 et de CD11b et l'absence d'expression de CD3. L'ARN a été extrait et l'expression de l'ensemble des gènes a été analysée par RNA Seq. Puis les profils ont été comparés entre les différentes conditions au cours du temps et sont représentés sous la forme de Volcano plots comme indiqué. Les points apparaissant en rouge représentent des gènes différentiellement exprimés (P-valeur ajustée  $< 0.05$ ). Cette expérience représente les données issues d'une expérience qui incluait 3 souris par groupe.

aux stades précoces et intermédiaires mais sont finalement peu différentes au stade terminal, c'est à dire quand la tumeur est apparue pour les RMA KR.

Nous nous sommes ensuite intéressés plus précisément aux voies moléculaires dérégulées par analyse de l'enrichissement des groupes de gènes (GSEA) aux temps tardifs afin de rechercher des causes de la perte de fonction dans la situation RMA-KR. La comparaison a été faite avec les cellules NK de souris RMA au temps tardif (Figure 53A). Dans la condition RMA-KR, les voies diminuées comparées aux RMA sont les voies de la phosphorylation oxydative (OXPHOS), les voies de signalisation liées à myc et à mTOR, les voies de réponse aux IFN, la réparation de l'ADN, le ribosome, la traduction et le protéasome.

Enfin, le transcriptome des cellules NK provenant de souris RMA ou RMA-KR à des temps tardifs a été comparé aux signatures de l'épuisement disponibles dans la littérature concernant les LT CD8<sup>+</sup> en contexte infectieux (Bensch et al., 2018) ou tumoral (Singer et al., 2016) (Figure 53B). Dans les cellules NK de souris RMA, on retrouve le module d'activation établi par Singer/Anderson, alors que c'est le module « dysfonction » qui est retrouvé dans les RMA-KR. De la même manière, la signature épuisée proposée par Bensch *et al.*, est enrichie dans les RMA-KR. Nos données semblent donc globalement correspondre à ce qui a été proposé pour les LT CD8<sup>+</sup> épuisés. Les principaux gènes dérégulés vont maintenant être validés par PCR quantitative (qPCR) et immuno-marquage. Les gènes les plus sur-exprimés au temps tardif par les cellules NK de RMA KR comparés aux RMA sont : *Itgad*, *Gm4956*, *Igkc*, *Serpine2*, *Dpp8*, *Asb7*, *Mef2c*, *Tox*, *Pex11g*. A l'inverse, ceux plus exprimés dans les RMA sont les gènes suivants : *Sem1*, *Qrsl1*, *F2rl2*, *Cd52*, *Lgals1*, *Cox7b* et *Dbi*. D'autres comparaisons seront également réalisées (avec les cellules NK contrôles et aux différents temps).



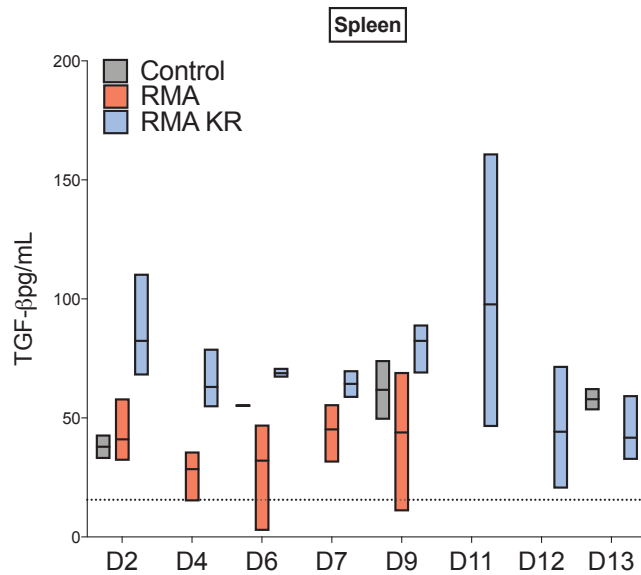
**Figure 53: Analyse GSEA des voies moléculaires dérégulées**

(A) Divers ensembles de données d'expression publique ont été utilisés pour identifier les gènes dont l'expression est modulée dans les cellules NK de souris RMA, RMA KR comparées entre elles ou à des cellules NK de souris contrôles aux temps tardifs. Pour tester statistiquement si ces ensembles de gènes sont enrichis dans les conditions spécifiques, nous avons réalisé des comparaisons par paires entre les conditions en utilisant la méthode GSEA. L'enrichissement était considéré comme significatif pour un FDR (false discovery rate)  $< 0,05$ . Les FDR sont indiqués sur les histogrammes. (B) Les profils d'enrichissement pour les modules « dysfonction » et « exhausted » sont représentés pour les cellules NK de souris RMA KR.

## 2.2.4 Causes extrinsèques

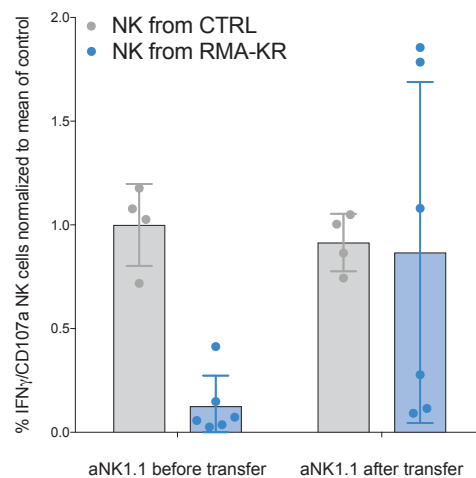
Certains facteurs extrinsèques, notamment l'environnement cellulaire et cytokinique de la tumeur, peuvent participer au processus d'épuisement. Ainsi, nous avons développé deux panels permettant l'étude de la composition cellulaire myéloïde et lymphoïde au sein du TME, c'est-à-dire dans notre cas dans la rate. Cette expérience avait pour but de déterminer si certains types cellulaires immunosuppresseurs comme les T regs et MDSC sont sur-représentés, et si d'autres types de cellules participant activement à la réponse immunitaire sont à l'inverse sous-représentés par rapport aux rates de souris RMA ou contrôles. Cependant, la plupart des types cellulaires sont présents de manière similaire aux souris RMA (globules rouges, lymphocytes B, T, NKT, Treg, monocytes, macrophages, éosinophiles, neutrophiles et basophiles) (données non montrées). Ces analyses préliminaires devront cependant être répétées et les données corrélées à la charge tumorale qui peut différer entre les conditions RMA et RMA-KR aux temps analysés.

Le TGF- $\beta$  est une puissante cytokine immunosuppressive qui peut bloquer l'activation de mTOR dans les cellules NK. Cette cytokine est sécrétée sous une forme latente qui peut ensuite être activée sous l'action de MMP (« Matrix MetalloProteinase »). Nous avons utilisé un test ELISA permettant de mesurer spécifiquement la forme active à partir d'échantillon de rate. Les rates de souris contrôles, de souris RMA ou RMA-KR ont été prélevées à différents temps et écrasées dans un volume très faible de milieu (1mL). Les cellules ont été centrifugées et le surnageant a été analysé par test ELISA (Figure 54). En parallèle, le sérum des mêmes individus a été isolé après prélèvement sanguin et également analysé pour les mêmes cytokines (données non montrées). Nos données semblent suggérer une augmentation de TGF- $\beta$  dans les souris présentant des cellules NK dysfonctionnelles (souris RMA-KR) par rapport aux souris RMA ou contrôles. Cependant, cette augmentation est faible, car les variations mesurées sont de l'ordre de 50 pg/mL et elle chute aux stades terminaux (D12/D13). Ces résultats sont issus d'une seule expérience, réalisée en cinétique et devront donc être répétés. Les statistiques n'ont pas été calculées.



**Figure 54:** Analyse du taux de TGF-β dans la rate de souris porteuses de tumeur

$5 \times 10^7$  RMA ou RMA-KR ont été injectées dans des souris C57BL/6 de 8 semaines. Les souris ont été sacrifiées à différents temps (D2=J2 à D13=J13) et la rate a été écrasée dans 1mL de milieu. Les cellules ont ensuite été centrifugées et le surnageant a été analysé par test ELISA mesurant spécifiquement la forme active du TGF-β. Les résultats représentent les données issues d'une seule expérience qui incluait 4 souris par groupe.



**Figure 55:** Transfert adoptif de cellules NK épuisées

$5 \times 10^7$  RMA-KR ont été injectées dans des souris C57BL/6 de 8 semaines. Les souris RMA-KR ou des souris contrôles ont été sacrifiées à J13 puis les cellules NK spléniques ont été purifiées et leur fonctionnalité a été analysée après stimulation avec un anti NK1.1 à  $10 \mu\text{g/mL}$ . Les cellules NK purifiées ont ensuite été retransférées dans des souris Ly5a hétérozygotes pendant 10 jours. Les souris hôtes ont ensuite été sacrifiées et les cellules NK de la rate ont été purifiées et leur fonctionnalité analysée de la même façon. Les données avant (before) et après (after) transfert sont présentés de manière normalisée par rapport au contrôle du jour de l'expérience. Les résultats représentent les données issues d'une seule expérience qui incluait 6 souris pour le groupe RMA-KR et 4 souris pour le groupe contrôle.

## 2.2.5 Tentatives de restauration

Ce modèle a donc permis de proposer différentes pistes pouvant expliquer la perte de fonctionnalité des cellules NK. Nous souhaitons ensuite tester des stratégies permettant de revigorer les cellules NK.

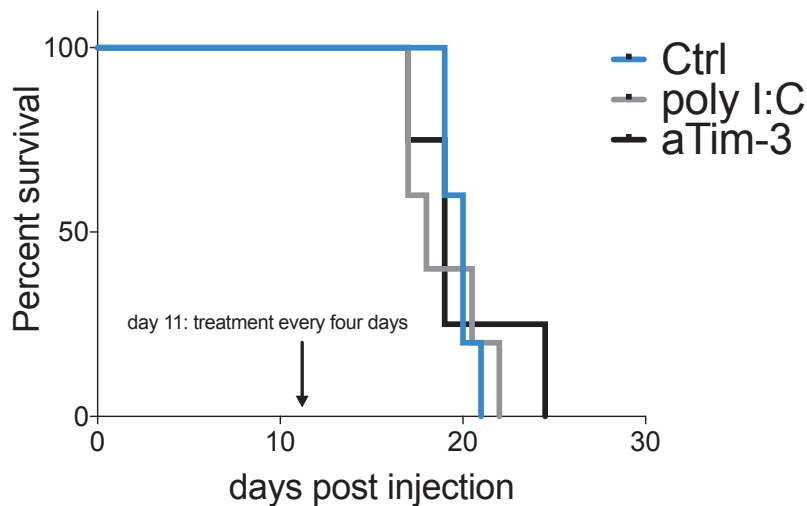
- Retirer le signal de stimulation chronique suffit-il à restaurer l'activité des cellules NK ?

Premièrement, la comparaison RMA et RMA-KR permet de confirmer qu'une stimulation persistante des récepteurs est bien suffisante à induire la perte de fonction. C'est pourquoi, nous avons tout d'abord analysé la fonctionnalité des cellules NK après avoir retiré le signal de stimulation chronique. Pour cela, les cellules NK de souris RMA-KR ont été purifiées au stade terminal et transférées dans des souris naïves sans tumeur. La fonctionnalité de ces cellules a été testée avant transfert (**Figure 55, before**). Après 10 jours de « repos » dans des hôtes naïfs non porteur de tumeur, nous avons examiné la fonction des cellules NK après restimulation *ex vivo* (**Figure 55, after**). Si pour trois des points analysés, la fonctionnalité des cellules NK a été « récupérée », pour trois autres points, la perte de fonction s'est maintenue. La perte de fonction semble donc être un processus réversible sous certaines conditions. Ces conditions restent cependant à définir. Une explication que nous pouvons fournir est le fait que pour certaines souris, les échantillons purifiés contenaient encore des cellules tumorales lors du transfert et uniquement 30% de cellules NK. L'expérience sera répétée.

- Stimuler les cellules NK améliore-t-il la survie des souris ?

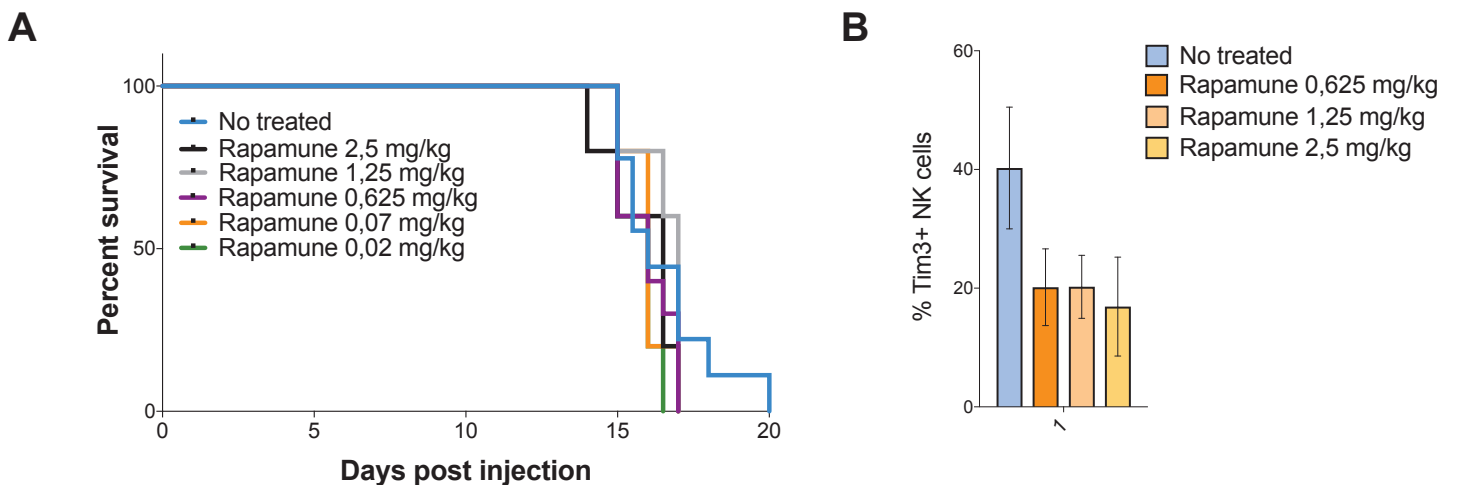
Plusieurs stratégies d'amélioration de l'activité des cellules NK épuisées ont été testées et rapportées dans la littérature (Chiossone et al., 2018; Souza-Fonseca-Guimaraes et al., 2019) : comme par exemple 1- des stimulations cytokiniques (Ardolino et al., 2014; Ohs et al., 2017; Seo et al., 2017a) ou 2- le blocage d'ICP exprimés par les cellules épuisées (Hsu et al., 2018; Zhang et al., 2018b). Afin de tenter d'améliorer les performances fonctionnelles des cellules NK *in vivo*, nous





**Figure 56: Survie des souris après injection de poly (I:C) ou d'un anti Tim-3**

$5 \times 10^6$  RMA-KR ont été injectées dans des souris C57BL/6 de 8 semaines. Les souris ont ensuite été traitées ou non par injection en i.p de poly (I:C) (100  $\mu$ g) ou d'un anti Tim-3 (200  $\mu$ g) à partir du jour 11 puis tous les quatre jours. Les courbes de survie sont représentées et ont été analysé par la méthode Kaplan Meier. Les résultats représentent les données issues d'une seule expérience qui incluait 5 souris par groupe.



**Figure 57: Effet d'un traitement à la Rapamycine**

$5 \times 10^6$  RMA-KR ont été injectées dans des souris C57BL/6 de 8 semaines. Les souris ont ensuite été traitées ou non avec différentes doses de Rapamycine exprimées en mg/kg comme indiqué à partir du jour 4 puis tous les jours. Les courbes de survie des souris sont représentées et ont été analysées par la méthode Kaplan Meier. (A). Pour certaines doses, le jour du sacrifice des souris, l'expression de Tim-3 a été analysée sur les cellules NK spléniques par cytométrie en flux (B). Les résultats représentent les données issues d'une seule expérience qui incluait 5 souris par groupe.

avons donc injecté un analogue de l'ARN double brin (db), le poly (I:C) afin d'induire la production de cytokines telles que l'IL-15 dans la circulation, ou un anticorps anti Tim-3 bloquant (Figure 56). Nous avons choisi de commencer le traitement à un temps critique, le jour 11 qui correspond approximativement au moment où la vitesse de pousse tumorale augmente (phase d'échappement). Puis les souris ont été traitées tous les quatre jours. Aucun de ces deux traitements n'augmente la survie des souris (Figure 56). Différents paramètres de ce protocole (début du traitement, fréquence d'injection) pourraient être testés. Cependant, nous n'avons pas regardé l'épuisement dans la rate à proprement dit dans ces expériences.

- Freiner l'activation des cellules NK permet-il de restaurer leur fonction ?

Comme le montre la Figure 46, nous avons observé entre autres, une augmentation de l'activité de la kinase mTOR au niveau basal. En nous basant sur les données précédentes de l'équipe qui suggèrent qu'un niveau optimal d'activité de mTOR est requis pour obtenir un niveau de réactivité idéal, nous avons décidé de cibler cette kinase à l'aide d'un inhibiteur spécifique mais partiel de mTORC1 fréquemment utilisé en clinique, la rapamycine. Afin d'isoler un effet bénéfique de la Rapamycine sur les cellules NK épuisées d'un effet anti-tumoral de cette drogue, nous avons tout d'abord généré des lignées RMA et RMA-KR insensibles à la rapamycine (Rodrik-Outmezguine et al., 2016). Nous avons injecté ces nouvelles lignées et testé si la survie des souris était améliorée par un traitement à la Rapamycine.

Les cellules RMA et RMA-KR rapamycine résistantes (RR) poussent à la même vitesse que leurs homologues sensibles *in vitro* comme *in vivo* (données non montrées). *In vivo*, la pousse des cellules RMA n'est pas affectée par le traitement à la rapamycine, ce qui valide leur résistance.

L'objectif étant d'inhiber de façon partielle l'activité de la voie mTOR dans les cellules NK, cinq doses ont été testées sur la base de données publiées sur l'impact d'un traitement avec du vistuzertib, un inhibiteur de mTORC1/mTORC2 (Langdon et al., 2018) et sur les doses de rapamycine utilisée dans d'autres études (Araki et al., 2009) ou chez des patients.

Malheureusement, nous n'avons pas réussi à améliorer la survie des souris avec ce type de traitement (Figure 57A). Par contre, certains de nos résultats suggéraient un effet positif du traitement notamment en diminuant l'expression de Tim-3

(Figure 57B). Cet effet peut être dû au blocage de l'activation. Nous aimerions maintenant tester l'impact du traitement sur la fonction des cellules NK en testant leur capacité à répondre *ex vivo*.

En conclusion, ce modèle permettra également de tester d'autres pistes thérapeutiques qui seront développées dans la discussion.

## 2.3 Matériel et méthodes complémentaires

### ***Procédures in vivo***

Toutes les expériences ont été approuvées par le comité de bioéthique local (CECCAPP) selon les recommandations françaises et les règles européennes (86/609/CEE.) Les souris C57BL/6 ont été achetées au laboratoire Charles Rivers (l'Arbresle). Les souris Ly5a hétérozygotes sont élevées au sein du Plateau de biologie expérimental de la souris (PBES, ENS de Gerland). Des souris de 8 semaines sont utilisées dans les différentes expériences sauf en cas d'indications contraires. Pour les injections par voie sous-cutanée, les cellules tumorales ont été suspendues dans 100 µL HBSS (Gibco) et  $5 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^4$  ou  $5 \times 10^5$  cellules ont ensuite été injectées dans le flanc droit des souris. Pour les expériences de déplétions des cellules NK, les souris ont été injectées avec 200 µg de PK136 (Bioxcell) par voie intra-péritonéale (i.p) aux jours indiqués. Les déplétions ont été confirmées par marquage des cellules avec un anti NKp46 et un anti CD122. Dans certaines expériences, les souris ont été traitées avec 100 µg de poly (I:C) (Invivogen) ou 200 µg d'anti Tim-3 (clone RMT3-23, Bioxcell) par injections i.p au jour 11 post injection des cellules tumorales puis tous les 4 jours. Dans d'autres expériences, les souris ont été traitées avec de la Rapamycine (Everolimus) aux doses indiquées à partir du jour 4 post injection des cellules tumorales.

### ***Génération des lignées rapamycine-résistantes***

Pour rendre les cellules RMA ou RMA KR résistantes à la rapamycine, nous avons introduit une mutation dans le gène codant pour mTOR, décrite précédemment (Rodrik-Outmezguine et al., 2016) par la technique de CRISPR/Cas9 utilisant des RNP. Brièvement,  $0,5 \times 10^6$  cellules RMA ou RMA KR ont été électroporées par utilisation de l'appareil Néon (ThermoFischer) avec les complexes RNP qui ont été formés selon le protocole de (Jacobi et al., 2017). Les paramètres suivants ont été utilisés pour l'électroporation : 1600 Volts, 10ms, 3 pulses. La séquence du guide utilisé est TCTACTATCACGTGTTTCAGAC**CGG** (en gras, le PAM, ne fait pas partie du guide) et la matrice utilisée est :

ATAAGTCTCCAGCAGAAGCGAGTCTGGATGCACAGATGAACCCAGGATGCCTC

GAGAGCCTACCTGGGGTAGCTGCTTTGAGATgCGTCTTAACACGTGATAGTAGA  
GGTCCCAGGCTTGCGTGAGG. Les cellules ont ensuite été cultivées en présence  
de Rapamycine à 25nM (Calbiochem).

### ***Immunomarquage***

$1,5 \times 10^6$  de cellules ont été immunomarquées pendant 30 minutes à 4°C avec l'anticorps approprié (la liste des anticorps est résumée dans le Tableau 4). Pour les marquages intracellulaires (hors événements de phosphorylation dont le protocole de marquage est détaillé dans l'article 1), les cellules ont été lysées avec le kit CytoFix/cytoperm (BD Biosciences) ou avec le kit Foxp3 Fixation/Permeabilization Concentrate and Diluent (eBioscience) pour les facteurs de transcription pendant 30 minutes à 4°C puis marquées pendant 30 min à 4°C avec l'anticorps appropriée (cf Tableau 4). Les analyses de cytométrie en flux ont été réalisées via l'utilisation d'un LSR Fortessa (Becton-Dickinson) et les données analysées par utilisation du logiciel FlowJo 10.5.0.

### ***Mesure du flux calcique***

Le flux calcique a été mesuré comme décrit précédemment (Guia et al., 2011). Les splénocytes ont été analysés après lyse des globules rouges (RBC), et resuspendus dans du milieu RPMI contenant 0,2% BSA, et 25mM Hépès puis marqués avec les anticorps suivant anti- CD3/CD19 PEEFluor610, anti-CD49b APC, anti-CD11b APCCy7, anti-CD27 PE durant 30 minutes à RT. Puis  $1 \times 10^7$  cellules/mL ont été incubés avec la sonde Indo-1 (1mM, Life Technologies) pendant 30 minutes à 37°C. Les cellules ont ensuite été lavées deux fois à 4°C puis resuspendues dans le milieu et placées à 37°C avant l'acquisition en présence ou absence d'IL-15 recombinante murine (100 ng/mL). Les échantillons ont été acquis sur un LSR II (Becton Dickinson) de la manière suivante : acquisition basale de 15 sec, puis addition d'un anti NK1.1 (PK136, 5 mg/mL), acquisition durant 1 min 30, addition de streptavidine (10 mg/mL, Life Technologies) et acquisition pendant 3 à 5 minutes.

### ***Cytométrie en flux en images***

$1 \times 10^6$  cellules NK purifiées ont été marquées avec un anticorps anti CD3/19 APC-ef780 et un anti CD122 APC (Biolegend), avec ou sans CD45.2 BV510 (BD Biosciences). Les populations de cellules NK contrôles (non marquées pour CD45.2) ou les cellules NK de souris porteuses de tumeurs ont été mélangées à un ratio 1:1. Ce mélange a ensuite été ajouté à une suspension de cellules YAC-1 préalablement marquées au CTV à un ratio 1:1 dans une plaque 48 puits et incubé pendant 20 min à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>. Les cellules ont ensuite été fixées/perméabilisées par ajout de cytofix/cytoperm (BD Biosciences) puis marquées avec la phalloïdine CF488 (WWR, Biotium). Les échantillons ont été acquis sur un ImageStream X Mark II 4 lasers

(Amnis-EMD Millipore, Darmstadt, Germany) à un grossissement X40 et analysés avec le logiciel IDEAS (v6.0).

### **SeaHorse**

Le taux de consommation d'O<sub>2</sub> (OCR) et le taux d'acidification extracellulaire (ECAR) ont été mesurés dans du milieu XF (DMEM non tamponné contenant 2mM de Glutamine au pH 7,4) en condition basale et en réponse à 25mM de glucose, 1µM d'oligomycine, 1,5M de FCCP + 1mM de pyruvate et à 1µM d'actimycine + Roténone 0,1µM par utilisation de l'Analyser de flux extracellulaire XFp (SeaHorse, Agilent). 400 000 cellules NK/puits ont été analysées après tri en cytométrie en flux et déposées dans des plaques de SeaHorse contenant du Cell Tak (Corning). L'OCR et l'ECAR ont été analysés en temps réel durant 155 minutes après adhésion.

### **Tests métaboliques**

1,5x10<sup>6</sup> de splénocytes ont été incubés avec les sondes Mitotracker Green<sup>FM</sup> (1µM, ThermoFisher) et MitoSOX<sup>TM</sup> Red Mitochondrial Superoxide Indicator (5µM, ThermoFisher) dans du PBS pendant 10 minutes à 37°C puis lavées avant d'être immunomarquées pour détecter les cellules NK. Les données ont été acquises sur un LSF Fortessa (Becton Dickinson) et analysées par utilisation du logiciel FlowJo 10.5.0.

### **Extraction d'ARN et analyse par RNA Seq**

50 000 cellules NK de souris RMA, RMA-KR ou contrôles ont été triées par cytométrie en flux aux différents temps indiqués. Les banques d'ARN ont été préparées selon le protocole de Picelli et al., comme décrit dans Nature protocols. L'ARN total a été purifié à partir de 50 000 cellules en utilisant le kit Direct-Zol RNA microprep (Ozyme) selon les recommandations fournies et a été quantifié par utilisation du QuantiFluor RNA system (Promega). 1µl de 10µM d'amorce Oligo-dT et 1µl de 10µM de dNTPs ont été ajoutés à 0.3ng d'ARN total dans un volume final de 2.3µl. Les Oligo-dT ont été hybridés 3min à 72°C et une réaction de transcription inverse a été réalisée comme décrit dans Nature protocols. Les ADN complémentaires (ADNc) ont été purifiés sur des billes AmpureXP (Beckman Coulter) et la qualité a été vérifiée sur une bande de criblage D5000 et analysée sur une station de bande 4200 (Agilent). 3 ng d'ADNc ont été marqués à l'aide du kit de préparation d'échantillons d'ADN Nextera XT (Illumina). Les fragments marqués ont ensuite été amplifiés à la suite de cycles de PCR et purifiés sur des billes AmpureXP (Beckman Coulter). La qualité de la banque a été vérifiée sur une bande d'écran D1000 et analysée sur une station de bande 4200 (Agilent). Le séquençage des banques a été effectué par la plateforme GenomEast, membre du consortium «France Génomique» (ANR-10-INBS-0009).

## GSEA Analysis

Divers ensembles de données d'expression publique ont été utilisés pour identifier les gènes dont l'expression est modulée dans les cellules NK de souris RMA, RMA KR comparées entre elles ou à des cellules NK de souris contrôles (Broad MIT Hallmarl and Kegg datasets, (Bengsch et al., 2018; Singer et al., 2016). Pour tester statistiquement si ces ensembles de gènes sont enrichis dans les conditions spécifiques, nous avons réalisé des comparaisons par paires entre les conditions en utilisant la méthode GSEA (logiciel disponible sur : <http://www.broad.mit.edu/gsea>). L'enrichissement était considéré comme significatif pour un FDR (false discovery rate) <0,05.

## Quantification du TGF- $\beta$ 1

La rate des souris a été prélevée et écrasée dans 1mL de milieu RPMI + 10% de SVF. Les cellules ont été centrifugées puis le surnageant a été prélevé et congelé à -80°C en attendant les analyses. Les niveaux de TGF- $\beta$ 1 actifs ont ensuite été mesurés par utilisation d'un test ELISA spécifique LEGEND MAX™ Free Active TGF- $\beta$ 1 ELISA Kit with Pre-coated Plates (Biolegend) selon les recommandations.

**Tableau 4: Anticorps utilisés**

Antigène murin	Clone	fluorochrome
Anti Rabbit IgG	Poly4064	BV510
B 2 microglobulin	S19.8	BV421
CD 3	145-2C11	BV650
CD 11b	M1/70	AlexaF 700
CD 19	1D3	BV650
CD 27	LG.3A10	BUV737
CD 45.1	A20	BUV395
CD 45.2	104	AlexaF 700
CD 48	HM-48-1	biotine
CD 54	YN1/1.7.4	biotine
CD 69	H1.2F3	PE Cy7
CD 71	R17217	PerCP-eFluor710
CD 84	PE	REA212
CD 96	6A6	BV421
CD 98	RL388	AF647
CD102	3C4 (MIC2/4)	AF488
CD107a (LAMP-1)	1D4B	FITC
CD122	TM-b1	APC
CD150	9D1	APC
CD155	3F1	BV421
CD223 (Lag-3)	eBioC9B7W	PE
CD226 (DNAM-1)	10 E5	PE-Dazzle594
CD229 (Ly9)	Biotine	Ly9ab3
CD244 (2B4)	AlexaF 647	m2B4 (B6)458.1
CD279 (PD-1)	J43	PerCP-eFluor710
CD352/SLAMF6/NTBA/Ly108	13G3	FITC
Granzyme B	NGZB	PerCP-eFluor710
H-2Db	KH95	PE
H-2Kb	AF6-88.5	BV510
IFNg	XMG1.2	PE
Ki-67	SolA15	AlexaF 647
NK1.1	PK136	APC
NKG2D	CX5	PE
Nkp46	29A1.4	AlexaF 647
Nur77	12.14	alexa fluor 488
phospho-Akt (Ser 473)	M89-61	Pe-CF594
phospho-ERK1/2 (T202/pY204)	20A	AF488
phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser 235/236)	D57.2.2E	PE
phospho-STAT5 (Y694)	47/stat5(pY694)	AF488
Rae1 Pan	REA723	PEvio770
Streptavidine		BUV496
TIGIT	1G9	BV711
Tim 3	215008	PE

## 2.4 Étude clinique d'une cohorte de patients CHB

Le deuxième article présente l'étude du phénotype et de la fonctionnalité des cellules NK circulantes d'une cohorte de patients infectés chroniquement par le virus de l'Hépatite B. Cette cohorte a été obtenue grâce à une collaboration avec le CHU de Limoges. Nous sommes en train de finaliser cet article.

### État de l'art :

- Une perte de fonctionnalité des cellules NK, similaire à de l'épuisement a été observée en contexte d'infections chroniques par le VHC, le VIH et le VHB
- Les mécanismes conduisant à cette perte demeurent peu caractérisés
- Les patients infectés par le VHB (patients CHB) présentent des niveaux élevés de TGF- $\beta$  et des concentrations circulantes faibles d'IL-15 ce qui pourrait contribuer à une perte d'activité de la kinase mTOR essentielle à la réactivité des cellules NK

### Principaux résultats :

- Baisse d'expression de NKp30 et de CD16 dans les cellules NK de patients
- Diminution de la capacité à produire de l'IFN- $\gamma$  et MIP1- $\beta$  mais dégranulation à l'état basal
- Augmentation de l'activation de la voie Erk à l'état basal et diminution de l'activité de la kinase mTOR après stimulation par l'IL-15
- Niveaux plus élevés de TGF- $\beta$  dans le sérum de patients

### Impacts :

- Identification de deux voies moléculaires impactées : Erk et mTOR
- Nouvelles cibles thérapeutiques potentielles
- Base pour de futures études précisant les mécanismes à la fois dans le contexte de l'infection au VHB mais également pour d'autres situations chroniques (autres types d'infection ou cancer)

## 2.3.1 Article 2

### NK cells from CHB patients exhibit constitutive pERK, degranulation, impaired mTOR activity and diminished CD16 expression

M. Marotel<sup>1,2,3,4,5</sup>, I. Tout<sup>1,2,3,4,5</sup>, L. Besson<sup>1,2,3,4,5,6</sup>, M. Pujol<sup>1,2,3,4,5</sup>, M. Ainouze<sup>1,2,3,4,5</sup>, G. Roblot<sup>1,2,3,4,5</sup>, S. Viel<sup>1,2,3,4,5,6</sup>, V. Loustaud<sup>7</sup>, S. Alain<sup>7</sup>, M. Gomez<sup>7</sup>, O. Allatif<sup>1,2,3,4,5</sup>, Durantel D<sup>8</sup>, T. Walzer<sup>1,2,3,4,5</sup>, A. Marçais<sup>1,2,3,4,5</sup>, U. Hasan<sup>1,2,3,4,5</sup>

1 CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie - International Center for Infectiology Research, Lyon, France.

2 Inserm, U1111, Lyon, France.

3 Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon, France.

4 Université Lyon 1, Lyon, France.

5 CNRS, UMR5308, Lyon, France

6 Service de biologie, Hospices Civils de Lyon and Université Claude-Bernard Lyon 1, Lyon, France.

7 Département de Microbiologie, CHU de Limoges, Faculté de médecine-Université de Limoges

8 Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL), INSERM, U1052, CNRS, Université de Lyon, UMR-5286

#### Contact / corresponding authors:

Uzma Hasan and Marie Marotel

Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI)

INSERM U1111 – CNRS UMR5308, Université Lyon 1, ENS de Lyon

21 Avenue Tony Garnier - 69365 LYON cedex 07, France

Tel +33 (0)437 28 23 49. E-mail: [uzma.hasan@inserm.fr](mailto:uzma.hasan@inserm.fr), [marie.marotel@inserm.fr](mailto:marie.marotel@inserm.fr)



## **Abstract**

NK cells are innate immune lymphocytes involved in the early control of infection and in tumor immunosurveillance. However, in chronic infection, NK cells are poorly functional; displaying altered receptor profiles, loss of cytokine production and are therefore termed tolerant and more recently exhausted. The underlying mechanisms leading to NK cell dysfunction are still unclear. Using a cohort of HBV chronic carriers, we demonstrate that NK cell functionality is limited by two potential mechanisms. NK cells from HBV patients displayed constitutive Erk phosphorylation, TNF $\alpha$  production associated with spontaneous degranulation and a reduction in CD16 expression. Upon exposure to tumor cells, NK cells from HBV carriers failed to degranulate and produce IFN- $\gamma$ , and MIP-1 $\alpha$ . In addition, HBV carriers had increased TGF- $\beta$  levels and NK cells were impaired for mTOR activity as measured by pAKT and pS6. Our work widens the currently identified molecular hallmarks for deregulated NK cells that contribute to the failure of the immune system in chronic infections.

## Introduction

Hepatitis B Virus (HBV) targets the human liver. In 90-95% of adults, exposure to HBV leads to an acute infection that is rapidly cleared by the immune system. The remaining 5-10% of adults fail to control viral infection due to immune dysfunction which leads to chronicity<sup>1</sup> as a result, more than 290 million individuals worldwide are chronic carriers<sup>2</sup>. Since 2016, the goal of the World Health Organisation (WHO) is to prevent HBV transmission. However, amongst chronic carriers, only 10% are diagnosed, and only 5% out of 94 million individuals whom are eligible for treatment actually receive antiviral therapy<sup>3</sup>. This has been termed by WHO in 2018 as the 'missing millions' who are therefore predisposed to severe liver diseases, including cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Indeed, global deaths due to viral hepatitis rose to 1.4 million, by passing those from tuberculosis, HIV or malaria<sup>4</sup> (Global Health Estimates 2016, reviewed in Nature 2018). Although a vaccine is available and is extremely efficient, only 3% of infants receive the vaccine in low-income countries. Furthermore, in poor social areas within medium to high-income countries, HBV infection is significantly represented with rates that are similar to low-income countries making it a major public health threat<sup>5</sup>. Thus, the paradigm needs to shift from 'control to cure' in order to eliminate the disease. There is an increase interest to develop immune based therapies in order to achieve a functional cure for HBV infection. This stems from studies that have analyzed the profile of immunity during HBV infection.

Immune dysfunction in human by HBV has been intensely studied with vast reports using *in-vitro* models of HBV infection and cohorts of CHB patients. Here, many groups conclude that a defective innate immune response consequently reduces and alters HBV specific adaptive immunity. HBV has developed strategies to counteract the host defense and can actively suppress innate immune responses by blocking for example IFN- $\alpha$  production by plasmacytoid dendritic<sup>6,7</sup>, or IL-1- $\beta$ , IL-18 and IL-6 secretion by Kupffer cells<sup>8,9</sup> and by inhibiting TLR9 activity on B cells<sup>10</sup>. Furthermore, T cells are also affected and exhibit an exhausted phenotype characterized by the loss of effector functions (IFN- $\gamma$  production), the expression of immune checkpoints molecules (ICP) such as PD-1 and alterations in cell metabolism<sup>11,12</sup>.

Natural Killer (NK) cells have the capacity to secrete cytokines and release cytotoxic granules containing perforin and granzymes, which leads to lysis of the target cell. This makes NK cells essential in the early control of viral infection, tumor immunosurveillance and T cell regulation<sup>13</sup>. Their activation is controlled by the balance between positive signals arising from 1. activating receptors (NKaR) that engage stress ligands, 2. CD16 (FcγRIIIa), the low-affinity receptor for IgG, expressed by the majority of human NK cells, which is a potent activating receptor that facilitates antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) and 3. negative signals mediated by inhibitory receptors (NKiR) which interact with MHC class I molecules found on surrounding cells. NK cell reactivity is acquired through a process called education and is mediated by MHC class I specific NKiR<sup>14</sup>. Mechanistically, reactivity is controlled by the kinase mammalian target of rapamycin (mTOR)<sup>15</sup>. Stimulation of mTOR enhances signaling through NKaR and increases metabolic activity thus enabling NK cell activation. Furthermore, we have shown that IL-15 signaling also triggers mTOR activation<sup>16</sup>, thus leading to an increase in translation, metabolism, NK cell maturation and an increase in their effector functions. Interestingly, we have previously shown that all of these processes are antagonized by TGF-β, an anti-inflammatory cytokine that mediates its effect through inhibiting mTOR signaling<sup>17</sup>.

In murine models of HBV infection, data support a role for NK cells in the defense against HBV infection<sup>18</sup>. In addition, it has been revealed that NK cell activity differs during the different stages of HBV infection<sup>19</sup>. Early in the course of infection, patients with acute HBV infection have increased NK cell cytotoxicity<sup>20</sup>. Yet most reports have described an impaired function of NK cells in chronically infected HBV (CHB) patients. Several groups reported that NK cells from CHB patients have a decreased capacity to produce cytokines such as IFN-γ and TNF-α<sup>21-24</sup>. CHB patients also exhibited a downregulation of NKaR expression such as NKG2D<sup>23</sup> with an upregulation in the expression of NKiR such as NKG2A and immune checkpoint molecules such as T cell immunoglobulin and mucin domain containing 3 (Tim-3)<sup>25,26</sup>. Another study revealed that monocytes can promote interleukin (IL)-10 production by NK cells in CHB patients which consequently inhibits T cell function<sup>27</sup>. Sun *et al.* have shown that impaired production of IFN-γ by NK cells is associated

with high TGF- $\beta$  levels in patient's blood <sup>23</sup>. Of note, inhibition of IL-10 and TGF- $\beta$  restored the capacity of NK cells to produce IFN- $\gamma$  in CHB patients <sup>22</sup>. Moreover, NKG2D and 2B4 co-activating receptor expression was downregulated on NK cells from HBV<sup>+</sup> individuals. Also described in CHB patients are low plasma levels of IL-15, a crucial cytokine for NK cell development, proliferation and acquisition of effector functions <sup>28</sup>.

Thus, chronic HBV infection seems to be associated with NK cell dysfunction. However, many studies were based on limited numbers of patients or analysed a restricted number of NK cell parameters. Moreover, the mechanisms of NK cell dysfunction in CHB patients are still unclear. To address these issues, we used multiparametric flow cytometry to explore NK cell phenotype, responsiveness and molecular pathways in a cohort of HBV chronic carriers. To identify the mechanisms leading to tolerance/dysfunction, we have investigated possible alterations in mTOR signaling and metabolic pathways.

## **Results**

### **NK cell functionality is impaired in CHB patients**

CHB infection can be classified into four phases: immune tolerant (IT) i.e. HBeAg positive, high viral load and low Alanine Aminotransferase (ALT), 2- immune active; HBeAg positive, anti-HBeAg positive, variable viral load and high ALT 3- immune inactive, no HBeAg, anti-HBeAg positive low ALT and 4- a reactivation phase where the viral DNA increases with variable ALT. Clinical characteristics of patients and donors enrolled in this study are detailed in Table 1. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from immune inactive CHB patients as well as healthy donors (HD) were isolated and analyzed. NK cell activation is measured by their ability to respond to target cells, Fc Receptor (CD16) triggered antibody dependent cell cytotoxicity (ADCC), and in response to cytokine stimulation such as IL-12 and IL-18. First, we investigated NK cell functionality by measuring cytokine production (IFN- $\gamma$ , MIP1- $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) upon co-culture with the K562 target cell line (Figure 1A). K562 cells lack MHC I expression and therefore trigger spontaneous NK cell mediated lysis. NK cells from CHB patients exhibited a decreased capacity to produce IFN- $\gamma$  and MIP1- $\beta$  in

response to K562 stimulation. However, we observed that CHB patients and donors were able to produce similar amounts of TNF $\alpha$ .

To investigate whether ADCC was also altered in CHB patients, we analyzed NK cell functionality in response to Rituximab (an anti-CD20 monoclonal antibody) coated Granta cells (Figure 1B). The percentage of NK cells positive for IFN- $\gamma$  was diminished in patients (Figure 1B upper panel), no difference was observed MIP1- $\beta$  or TNF- $\alpha$  (Figure 1B). In parallel, cytokine production was also measured in response to interleukin (IL)-12 and IL-18 stimulation (Figure 1C). No significant differences in IFN- $\gamma$ , MIP1- $\beta$  or TNF- $\alpha$  production was observed between CHB and HD (Figure 1C).

Overall, the secretion of IFN- $\gamma$  was impaired following target cell and ADCC mediated activation. However, unlike other reports we did not observe a defect in IFN  $\gamma$  production in HBV carriers upon IL-12 +/- IL-18 <sup>22,23</sup>.

A subpopulation of NK cells have been identified in patients infected with human cytomegalovirus (HCMV) <sup>29</sup>. A particularity of these cells is that they have long-lived, as well as having antigen-specific memory responses to viruses. This subpopulation is termed memory like NK cells. NK memory cells are CD57<sup>+</sup>/ NKG2C<sup>+</sup>, and lack the expression of the adaptor protein FC $\epsilon$ R $\gamma$ 1. The emergence of this population in HBV<sup>+</sup> individuals has been linked to the co-infection of HCMV with HBV <sup>30</sup>. Moreover, CD16 mediated functions are increased whereas cytokine stimulation leads to a loss of memory NK cell to produce IFN- $\gamma$  in HCMV/HBV co-infected patients <sup>31</sup>. To exclude that co-infection with CMV influenced NK cell loss of function, CMV antibodies levels in HD and CHB patient's serum were examined. Among HD, 38% were positive for CMV whereas 92% were positive in the CHB cohort (Figure S1A). We also examined NKG2C expression a marker for memory NK cells, alongside CMV<sup>+</sup> and CMV<sup>-</sup> status (Figure S1B). We analyzed NK cell functionality by separating CMV<sup>+</sup> HD from CMV<sup>-</sup> HD (Figure S2). We observed that the production of IFN- $\gamma$ , MIP1- $\beta$  and TNF- $\alpha$  by NK cells from CMV<sup>+</sup> individuals was not affected upon K562 stimulation compared to CMV<sup>-</sup> HD. Therefore based on these data the CMV bias cannot explain the defaults in NK cell functionality observed in CHB patients.

### **NK cells from CHB patients display an altered phenotype**

In order to determine whether poor functionality alters receptor expression in NK cells, we measured the expression of NKaR and NKiR by flow cytometry (see methods and materials for the full panel). Activating receptors NKaR, NKp30 and CD160 expression was significantly decreased in patients vs HD (Figure 2A). Interestingly, NKG2D was elevated in CHB patients compared to HD (Figure 2A). No significant difference in expression was observed for NKp46, DNAM-1 or LFA-1. We also observed an overall decreased trend in the expression of NKiR (Figure 2B).

NK cells release and degranulate cytotoxic molecules such as granzyme B and perforin in order to kill virally infected or tumoral cells. Therefore, the basal levels of cytotoxic granules were analyzed, however no significant difference was observed between the groups (Figure 2C). Finally, we examined the expression of known exhaustion markers historically identified on CD8<sup>+</sup> T cells and more recently on NK cells in infectious or tumoral pathologies<sup>32,33</sup>. These include ICP: Tim-3, PD-1, TIGIT and Lag-3, as well as transcription factors: T-Bet, Eomes, Tox and Nur77. We noted that PD-1, TIGIT and Lag-3 expression on NK cells remained unaltered between CHB patients and HD (Figure 2D). Tim-3 expression, which has been shown to be induced on CD8<sup>+</sup> T and NK cells from CHB patients<sup>25,34</sup> was found decreased in our study along with T Bet (Figure 2D). Reported is the capacity of T-bet to induce Tim-3 expression in TH1 lymphocytes T cells and the same process can be proposed here in NK cells<sup>35</sup>.

Globally our results show that chronic infection with HBV alters the NK cell receptor repertoire in the periphery, but do not display the currently recognized phenotypical exhaustion profile.

### **A chronically activated signature distinguishes NK cells in CHB patients.**

NK cells kill their targets through the exocytosis of lytic granules. This mechanism requires the fusion of the granule membrane with the cytoplasmic membrane in NK cells, which causes the surface exposure of lysosomal-associated proteins such as CD107a. Although granzyme B and perforin levels were not altered in CHB patients (Figure 2C) we wanted to determine whether the process of degranulation was altered by examining CD107a levels on NK cells before and after stimulation with K562 target cells (Figure 3A).

We noted that the basal level of CD107a was up regulated on NK cells from CHB patients, suggesting that these NK cells are activated *in vivo* and spontaneously degranulate *ex vivo* (Figure 3A). However, when NK cell cytotoxicity was measured by the percentage of lysed K562, no significant difference was observed (data not shown). In parallel, we observed that the expression of CD16, involved in ADCC, was reduced on NK cells from CHB patients (Figure 3B), which may explain the decreased trend of IFN $\gamma$  production by NK cells seen in Figure 1A. This finding is compatible with a down-regulation of CD16 resulting from its chronic engagement as described in the literature<sup>36,37</sup>. Importantly, engagement of CD16 by antibody-coated target cells leads to Erk activation<sup>36</sup>. We then measured at basal state the phosphorylation (p) of Erk in total NK cells from patients compared to HD (Figure 3C). Interestingly, basal level of pErk was significantly elevated in CHB patients compared to HD. Furthermore, a positive correlation was observed between CD107a and pErk while CD16 expression negatively correlated with both these parameters strengthening our hypothesis (Figure 3D).

Plausibly, the two most important receptors responsible for mediating the effect of NK cells are NKG2D and CD16. As observed in Figure 2A NKG2D expression on NK cells was elevated in patients, although the percentage of NKG2D<sup>+</sup> NK cells was similar between HD and patients (data not shown). We therefore correlated NKG2D expression with CD16, as well as pErk and CD107a expression (Figure 3E). NKG2D expression is negatively correlated to CD16 expression and positively correlated to pErk and CD107a levels.

Overall, these data show that patient NK cells harbor phenotypic changes that are consistent with chronic stimulation via CD16; such as decreased CD16 expression and increased pERK and CD107 basal levels. In addition, we also found a concomitant increase in NKG2D expression.



### **mTOR activation is impaired in NK cells from patients**

Based on our previous results showing that NK cell responsiveness relies on mTOR activity<sup>15</sup>, we investigated the activation of mTOR upon IL-15 stimulation in NK cells from CHB patients and HD. mTOR is the catalytic subunit of two complexes mTORC-1 and mTORC-2. A classical read out of mTORC-1 activity is the level of ribosomal protein S6 phosphorylation (pS6) while Akt phosphorylation (pAkt) is used to determine the activity of mTORC-2. In addition, we used pSTAT5 as a control as it is induced by IL-15 stimulation while being independent of mTOR activation. CD56 bright NK cells are highly sensitive to IL-15 treatment to induce mTOR activity<sup>38</sup>, we thus focused our analysis on this population (Figure 4A). Basal levels of pS6 were not altered in CHB patients vs HD, yet upon IL-15 stimulation, mTOR activation was reduced in NK cells from CHB patients as shown by the decreased phosphorylation of both S6 and Akt. Moreover, the defects were specific to the mTOR pathway as IL-15 triggering of pSTAT5 was not affected (Figure 4A).

As mTOR is a key regulator of metabolism, we therefore investigated possible defects in the NK cells of CHB patients by measuring the expression of two metabolic markers controlled by mTOR: the amino-acid transporter CD98 and the transferrin receptor CD71. However, no significant difference was observed (Figure 4B). Another readout of metabolic activity is the cellular size that can be examined through the forward scatter (FSC-A) analysis by flow cytometry (Figure 4B). This parameter was not significantly different between NK cell from CHB and donors (Figure 4B). Finally, potential alterations in mitochondria activity were also examined by quantitative and qualitative studies. To this aim, we quantified the global mitochondrial mass using the Mitotracker dye, and reactive oxygen species (ROS) production using the MitoSox dye (Figure 4B). The global mitochondrial mass was not affected but the percentage of NK cells from CHB patients had an increased amount of ROS; a marker of defective mitochondria. This phenomenon could also contribute to NK cell loss of functions.



### **Serum TGF- $\beta$ levels are elevated in CHB patients**

Our group has previously shown that TGF- $\beta$  antagonizes mTOR activation and blocks this pathway through unknown mechanisms<sup>17</sup>. To assess whether weak mTOR activity could be attributed to TGF- $\beta$  mediated inhibition, we measured TGF- $\beta$  concentration in the sera of our cohort of CHB patients and HD (Figure 5A). Using a specific ELISA assay, we were able to detect the active form of TGF- $\beta$ 1. We found that CHB patients display higher levels of TGF- $\beta$ 1 in their serum, with an average amount of 160 (+/- 300) pg/mL compared to 22 pg/mL (+/- 130) for HD donors. However, no correlation between TGF- $\beta$  concentrations and the basal activity of mTOR pathway (pS6 MFI) was found (Figure 5B). Interestingly, we demonstrated a correlation between TGF- $\beta$  and ROS production (Figure S3). These results indicate that mTOR downregulation might be partly explained by increased TGF- $\beta$  levels but other regulators might also play a role.

### **Treatment with recombinant TGF- $\beta$ partly recapitulates exhausted phenotype**

To further test the effect of TGF- $\beta$  on NK cells, PBMCSs from five HD were incubated *in vitro* with human recombinant TGF- $\beta$  for 4 days to mimic chronic exposure. Cells were also cultured in presence of low concentrations of IL-15 allowing NK cell survival. PBMCSs were treated with two concentrations of TGF- $\beta$  representative of the amount found in CHB patients (0,1 ng/mL or 1 ng/mL) The impact of TGF- $\beta$  on NK cell phenotype was first determined (Figure 6A). As observed in CHB patients, a decreased trend in NKp30, TIM3, pS6 and NKG2A expression was seen in NK cells exposed to TGF- $\beta$  (Figure 6A). However, displaying the opposite profile seen in CHB patients were the ICP marker TIGIT, NKG2D and T-Bet. We also analysed the effect of TGF- $\beta$  on NK cell functionality on PBMCSs from 3 independent HD (Figure 6B). We demonstrated that both IFN $\gamma$  and CD107a expression was reduced by TGF $\beta$ , however neither TNF $\alpha$  nor MIP $\beta$  levels were altered. Conclusively, these data show that treatment with TGF- $\beta$  can partly recapitulate the altered phenotype and function of NK cells in patients, however other factors responsible for NK cell dysfunction in CHB patients still remain to be determined.

## Discussion

Here, we have addressed the systemic effect of HBV on peripheral NK cells from chronic inactive patients. We have deciphered several novel potential pathways that lead to NK cell dysfunction in CHB patients.

Activation of NK cells by co-culture with target cells led to a defect in IFN- $\gamma$  and MIP1- $\beta$ , but not TNF- $\alpha$  whereas no effect was seen on IL-12/IL-18 upon stimulation. These results conflict with certain studies where the authors have observed a decreased capacity to produce IFN- $\gamma$  upon stimulation with several cytokines or combinations: IL-12/18, IL-12/15 and IL-2, IL-21 or IL-12 alone<sup>21,22,24</sup>, and against K562 with IL-12 addition<sup>22</sup>. Compared to previous papers, we additionally determined ADCC function in CHB patients. In this setting, only IFN- $\gamma$  secretion is decreased while degranulation is spared.

Our results also showed that the functional potential of NK cells is severely impacted in CHB patients. We observed an increase in Erk and a decrease in mTOR phosphorylation/activation. In addition, diverse NKaR were downregulated in particular NKp30 and CD16, which could explain the reduction of NK cell responsiveness upon K562 stimulation<sup>39</sup> or Granta stimulation<sup>40</sup> respectively. However, no perfect correlation between IFN- $\gamma$  production after K562 or Granta stimulation and NKp30 or CD16 respectively, was observed (data not shown). This reduced function might require other NKaR. Our data show a tendency to decrease the expression of other NKaR. However, using our current statistical approach, no significant drop can be accounted for. More experiments with larger patient inclusions will therefore need to be performed.

Altered functionality of NK cells has been reported in the context of chronic infection and cancer and several reports point to a state of NK cell exhaustion<sup>41</sup>. However, the exhausted molecular markers examined for NK cells have been classified based on data identified for CD8+ T cells, mainly by LCMV infection<sup>42</sup>. A wealth of literature describing specific signature and phenotype of exhausted CD8+ T cells is available and several features characteristic of exhaustion can be identified: 1- progressive

loss of effector functions and proliferation capacity 2- strong expression of multiple inhibitory receptors such as ICP 3- disrupted response to IL-7 and IL-15 4- alterations in metabolism 5- specific transcriptional and epigenetic program and 6- modified expression of effector and memory T cell transcription factors <sup>32</sup>. Exhausted CD8+ T cells are typically characterized by immune checkpoint (ICP) expression such as PD-1, TIM-3, LAG-3, TIGIT, CD160, CTLA-4 <sup>43</sup>.

Surprisingly, inhibitory receptors, such as: NKG2A, Tim-3 or CD160, display decreased expression on CHB patients NK cells. In addition, we did not observe any induction of PD-1 or Lag-3 on NK cells. NK cell granule content was intact (*i.e* Granzyme B and perforin expression) and they conserved the capacity to kill target cells upon *ex vivo* re-stimulation contrary to what Sun *et al.*, have observed <sup>23</sup>. Thus, whether NK cells become exhausted as it has been described for T cells in CHB context is unclear and requires further investigations. The absence of a robust animal model slows down the complete understanding of mechanisms resulting in loss of NK cell function. In addition the lack of homogenization in terms of patient cohorts such as, infection phase, ethnic group, age, cohort size and statistical tests, renders the interpretation of the effects of HBV on NK cells obscure.

We observed a significant difference in the level of CD107a at steady state suggesting that NK cells are chronically activated *in vivo* and can spontaneously degranulate. The increased level of Erk phosphorylation, which is involved in the degranulation process, confirmed this data. Moreover, we found positive correlation between CD107a basal level and CD16 expression downregulation. This occurrence also arises in other infectious diseases and was associated with altered response *ex vivo*. For example, CD16 expression is diminished on NK cells co-culture with HCMV infected cells<sup>44</sup> as well as with HCV infected hepatocytes <sup>45</sup>. This phenomenon was also associated with increased degranulation and seen in our study <sup>44</sup>. Goodier *et al.*, have notably demonstrated that sustained CD16 engagement leads to modulation of NK cell functions and to its cleavage in influenza vaccinated individuals <sup>36</sup>. Moreover, the reduction of CD16 expression was abrogated by ADAM17 blockade, a matrix metalloproteinase (MMP) induced at the cell membrane upon activation <sup>45,40</sup>. In HIV context, CD16 is downregulated on NK cells expressing CD107a at steady state <sup>46</sup>. MMP inhibitors also restore NK cell altered ADCC in this situation <sup>47</sup>. Another study

showed that CD16 chronic interactions with anti-CD20 monoclonal antibodies establish NK cell hypo responsiveness in terms of cytotoxicity but not IFN- $\gamma$  production<sup>37</sup>. We also attempted to correlate clinical parameters with CD16 expression. Ultimately, we did not observe any correlation between NK cell functionality in patients with HBV DNA load, HBsAg or ALAT and ASAT levels (data not shown). Furthermore, Sun *et al.* observed a decreased number of circulating NK cells expressing NKG2D and 2B4 which was associated with the loss of effector functions measured by the percentage of IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> NK cells.<sup>23</sup> In our study, we observed upregulation of NKG2D which was found correlated with the increased basal level of degranulation and with pErk but negatively correlated with CD16 expression. Does the increased NKG2D expression compensate for decreased CD16? Both receptors are not activated by the same ligands but they converge on the pErk pathway<sup>48</sup>. Thus, we cannot exclude that pErk increase might result from NKG2D upregulation.

In our cohort of patients, NK cell functionality could be limited by two putative mechanisms. The first one involves CD16 chronic engagement possibly by circulating immune complexes formed between HBsAg and anti-HBsAg antibodies. We hypothesize that this could be the cause of the increased basal pErk levels and to sustained degranulation. Defining the precise molecular mechanism involved requires further studies. In addition, assessing CD16 shedding and reversion by MMP inhibitors for example could be interesting in CHB context. The difficulty to measure immune complexes in patient serum or to recapitulate their formation *in vitro* offers limitations to investigate the molecular mechanisms leading to CD16 reduction. Many groups have struggled to measure immune complexes in CHB patients (personal communication with Prof. Maini, UCL, London, UK). However, whilst preparing this manuscript a recent report revealed a method to measure these complexes<sup>49</sup>. Using this new method to dose HBsAg immune complexes we can therefore test our hypothesis.

The second putative mechanism relies on high TGF- $\beta$  levels in patients that could block mTOR pathway, increase ROS and decrease T-Bet expression in NK cells. These events contribute to the reduction of IFN- $\gamma$  production and to altered phenotype of NK cells. These data were corroborated *in vitro* using recombinant

TGF- $\beta$  where we partly recapitulated the dysfunctional phenotype observed in patients.

In conclusion, we have analyzed complete characteristics of NK cells in CHB patients and found that their immune function was partially lost. Although our work contradicts data from several previous reports of NK cell dysfunction in CHB patients, we highlighted potential molecular targets, Erk and mTOR that could be used in the development of novel therapies to restore NK cell functionality. Furthermore, we provide the evidence that NK cells from CHB patients are defective during the inactive phase despite the absence of clinically active disease. Based on our findings these patients may benefit from new therapies that boost the immune system thereby preventing further liver damage.

## **Materials and Methods**

### ***Patients and Healthy donors***

Peripheral blood samples from healthy subjects were obtained from the French blood agency (Etablissement Français du sang, Lyon, France). Human PBMCSs from CHB patients and clinical assessments were obtained during routine hepatitis follow-ups. All participants provided written informed consent in accordance with the procedure approved by the local ethics committee (Comité de Protection des Personnes, Centre Hospitalier Universitaire de Limoges, Limoges, France). Patients and healthy donor characteristics are detailed in Table 1. All patients were diagnosed as inactive carriers according to the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) guidelines for treatment of chronic hepatitis B<sup>50</sup>. HCMV status of patients and donors were determined by ELISA thanks to Dr. C. Ramière, Hôpital de la Croix Rousse, Lyon.

### ***PBMCSs isolation***

Human PBMCSs were separated from peripheral blood by Ficoll gradient centrifugation (Eurobio Laboratoires et AbCys) at room temperature (RT). Cells were

then resuspended in heat-inactivated FCS with 20% DMSO, progressively cooled down to -80°C and stored in cryotubes in liquid nitrogen.

### ***Cell culture and treatments***

Cells were cultured in RPMI 1640 medium (Invitrogen Life Technologies) supplemented with 10% of FCS, 2mM L-glutamine, 10 mM of penicillin/ streptomycin (HCL Technologies), and 1 mM sodium pyruvate (PAA Laboratories) and X mM HEPES (Gibco). For phosphorylated protein analysis, cells were stimulated with IL-15 (Peprotech, 100ng/mL) during 30 minutes at 37°C. Cell cultures were maintained with IL-15 (10ng/mL, Peprotech) at 37°C in an incubator with humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>/95% air and used for experiments after 72 hours of culture. In some experiments, cells were treated with recombinant TGF-β1 (rhTGF- β1, 10 ng/ml, R&D Systems).

### ***Flow cytometry analysis***

PBMCSs were rapidly thawed in medium heated to 37°C and kept overnight at 4°C before performing NK cell analysis. Cells were immunostained during 30 min at 4°C with the appropriate monoclonal antibodies detailed in Table S1. Intracellular staining of transcription factors, cytotoxic molecules and proliferation marker was performed with Foxp3 Fixation/Permeabilization concentrate and diluent (eBioscience). Intracellular staining of cytokines and chemokines was performed with Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences). Intracellular staining of phosphorylated proteins was performed with Lyse/Fix and Perm III buffers (BD Biosciences). Phosphorylated proteins were then stained during 40 minutes at RT. Flow cytometric analysis was performed on LSR Fortessa 5L (Becton-Dickinson). Fluorescence Minus One controls were used to set the gates and data were analyzed with FlowJo 10.5.0 software (Tree Star). Gating strategy is presented in Figure S4.

### ***NK cell stimulation***

Human PBMCSs were stimulated with recombinant human IL-12 (Peprtech) and IL-18 (R&D Systems) at 10 ng/mL each or co-cultured for 4 hours with K562 cells or with Rituximab coated Granta cells at a 1.1 ratio in presence of Golgi Stop (BD Biosciences). The percentage of NK cells positive for CD107a, MIP1 $\beta$ , IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$  was then analyzed by flow cytometry.

### ***Cytotoxic assay***

Human PBMCSs were stimulated overnight with recombinant human IL-15 (Peprtech) at 100 ng/mL. Cells were then co-cultured for 4 hours at different Effectors:Targets ratios with K562 NanoLuc+ generated by P. Vidalain's lab. Supernatant was collected and bioluminescence was measured using TEKAN Instrument after addition of Furmizain, the Nanoluciferase substrate (Promega).

### ***Metabolic analysis***

Human PBMCSs were incubated with MitoSOX Red (5 $\mu$ M) and with Mitotracker Green (1 $\mu$ M) (both from Molecular Probes, Life Technologies) in PBS during 10 minutes at 37°C before flow cytometry extra-cellular staining.

### ***Serum TGF- $\beta$ 1 quantification***

Active TGF- $\beta$ 1 serum levels in patients and healthy donors were measured using LEGEND MAX™ Free Active TGF- $\beta$ 1 ELISA Kit with Pre-coated Plates (Biolegend) according to the manufacturer's recommendations.

### ***Statistical analysis***

Data were proceeded with the R statistical environment. After cleaning empirically data from outliers, we transformed to Log scale the parameters that were showing log-normal distribution and kept others unchanged. Then we used a generalized linear model with binomial family (logistic regression model) in simple way, *i.e* one



regressor at time, to quantify for each biological parameter independently the probability to be linked to our outcome variable (= to be HD or Patients). The results for all parameters were taken together to correct for the multiple testing using the Benjamini-Hochberg method.

## References

1. Lai, C. L., Ratziu, V., Yuen, M.-F. & Poynard, T. Viral hepatitis B. *The Lancet* **362**, 2089–2094 (2003).
2. Plummer, M. *et al.* Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *Lancet Glob. Health* **4**, e609-616 (2016).
3. Polaris Observatory Collaborators. Global prevalence, treatment, and prevention of hepatitis B virus infection in 2016: a modelling study. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* **3**, 383–403 (2018).
4. WHO | Disease burden and mortality estimates. *WHO* [http://www.who.int/healthinfo/global\\_burden\\_disease/estimates/en/](http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates/en/).
5. Vaccarella, S. *et al.* Reducing Social Inequalities in Cancer: Evidence and Priorities for Research. (2019).
6. Martinet, J. *et al.* Altered Functions of Plasmacytoid Dendritic Cells and Reduced Cytolytic Activity of Natural Killer Cells in Patients With Chronic HBV Infection. *Gastroenterology* **143**, 1586-1596.e8 (2012).
7. Vincent, I. E. *et al.* Hepatitis B Virus Impairs TLR9 Expression and Function in Plasmacytoid Dendritic Cells. *PLOS ONE* **6**, e26315 (2011).
8. Zannetti, C. *et al.* Characterization of the Inflammasome in Human Kupffer Cells in Response to Synthetic Agonists and Pathogens. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **197**, 356–367 (2016).
9. Hösel, M. *et al.* Not interferon, but interleukin-6 controls early gene expression in hepatitis B virus infection. *Hepatol. Baltim. Md* **50**, 1773–1782 (2009).
10. Tout, I. *et al.* Hepatitis B Virus Blocks the CRE/CREB Complex and Prevents TLR9 Transcription and Function in Human B Cells. *J. Immunol.* **201**, 2331–2344 (2018).
11. Schurich, A. *et al.* The Third Signal Cytokine IL-12 Rescues the Anti-Viral Function of Exhausted HBV-Specific CD8 T Cells. *PLOS Pathog.* **9**, e1003208 (2013).
12. Schurich, A. *et al.* Distinct Metabolic Requirements of Exhausted and Functional Virus-Specific CD8 T Cells in the Same Host. *Cell Rep.* **16**, 1243–1252 (2016).
13. Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T. & Ugolini, S. Functions of natural killer cells. *Nat. Immunol.* **9**, 503–510 (2008).
14. Höglund, P. & Brodin, P. Current perspectives of natural killer cell education by MHC class I molecules. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 724–734 (2010).
15. Marçais, A. *et al.* High mTOR activity is a hallmark of reactive natural killer cells and amplifies early signaling through activating receptors. *eLife* **6**, (2017).
16. Marçais, A. *et al.* The metabolic checkpoint kinase mTOR is essential for IL-15 signaling during the development and activation of NK cells. *Nat. Immunol.* **15**, 749–757 (2014).
17. Viel, S. *et al.* TGF- $\beta$  inhibits the activation and functions of NK cells by repressing the mTOR pathway. *Sci. Signal.* **9**, ra19 (2016).
18. Dusséaux, M. *et al.* Viral Load Affects the Immune Response to HBV in Mice With Humanized Immune System and Liver. *Gastroenterology* **153**, 1647-1661.e9 (2017).



19. Zhao, J. *et al.* Natural killer cells are characterized by the concomitantly increased interferon- $\gamma$  and cytotoxicity in acute resolved hepatitis B patients. *PloS One* **7**, e49135 (2012).
20. Lunemann, S. *et al.* Compromised function of natural killer cells in acute and chronic viral hepatitis. *J. Infect. Dis.* **209**, 1362–1373 (2014).
21. Oliviero, B. *et al.* Natural killer cell functional dichotomy in chronic hepatitis B and chronic hepatitis C virus infections. *Gastroenterology* **137**, 1151–1160, 1160.e1–7 (2009).
22. Peppas, D. *et al.* Blockade of immunosuppressive cytokines restores NK cell antiviral function in chronic hepatitis B virus infection. *PLoS Pathog.* **6**, e1001227 (2010).
23. Sun, C. *et al.* TGF- $\beta$ 1 Down-Regulation of NKG2D/DAP10 and 2B4/SAP Expression on Human NK Cells Contributes to HBV Persistence. *PLoS Pathog.* **8**, e1002594 (2012).
24. Tjwa, E. T. L., van Oord, G. W., Hegmans, J. P., Janssen, H. L. A. & Woltman, A. M. Viral load reduction improves activation and function of natural killer cells in patients with chronic hepatitis B. *J. Hepatol.* **54**, 209–218 (2011).
25. Ju, Y. *et al.* T cell immunoglobulin- and mucin-domain-containing molecule-3 (Tim-3) mediates natural killer cell suppression in chronic hepatitis B. *J. Hepatol.* **52**, 322–329 (2010).
26. Li, F. *et al.* Blocking the natural killer cell inhibitory receptor NKG2A increases activity of human natural killer cells and clears hepatitis B virus infection in mice. *Gastroenterology* **144**, 392–401 (2013).
27. Li, H. *et al.* Regulatory NK cells mediated between immunosuppressive monocytes and dysfunctional T cells in chronic HBV infection. *Gut* **67**, 2035–2044 (2018).
28. Dunn, C. *et al.* Temporal analysis of early immune responses in patients with acute hepatitis B virus infection. *Gastroenterology* **137**, 1289–1300 (2009).
29. Schlums, H. *et al.* Cytomegalovirus infection drives adaptive epigenetic diversification of NK cells with altered signaling and effector function. *Immunity* **42**, 443–456 (2015).
30. Malone, D. F. G. *et al.* Cytomegalovirus-Driven Adaptive-Like Natural Killer Cell Expansions Are Unaffected by Concurrent Chronic Hepatitis Virus Infections. *Front. Immunol.* **8**, 525 (2017).
31. Schuch, A. *et al.* NK-cell responses are biased towards CD16-mediated effector functions in chronic hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.* **70**, 351–360 (2019).
32. McLane, L. M., Abdel-Hakeem, M. S. & Wherry, E. J. CD8 T Cell Exhaustion During Chronic Viral Infection and Cancer. *Annu. Rev. Immunol.* **37**, 457–495 (2019).
33. Wherry, E. J. *et al.* Molecular Signature of CD8<sup>+</sup> T Cell Exhaustion during Chronic Viral Infection. *Immunity* **27**, 670–684 (2007).
34. Wu, W. *et al.* Blockade of Tim-3 signaling restores the virus-specific CD8<sup>+</sup> T-cell response in patients with chronic hepatitis B. *Eur. J. Immunol.* **42**, 1180–1191 (2012).
35. Anderson, A. C. *et al.* T-bet, a Th1 transcription factor regulates the expression of Tim-3. *Eur. J. Immunol.* **40**, 859–866 (2010).
36. Goodier, M. R. *et al.* Sustained Immune Complex-Mediated Reduction in CD16 Expression after Vaccination Regulates NK Cell Function. *Front. Immunol.* **7**, (2016).
37. Capuano, C. *et al.* Anti-CD20 Therapy Acts via Fc $\gamma$ RIIIA to Diminish Responsiveness of Human Natural Killer Cells. *Cancer Res.* **75**, 4097–4108 (2015).
38. Wagner, J. A. *et al.* CD56bright NK cells exhibit potent antitumor responses following IL-15 priming. *J. Clin. Invest.* **127**, 4042–4058 (2017).
39. Brandt, C. S. *et al.* The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans. *J. Exp. Med.* **206**, 1495–1503 (2009).
40. Deguine, J., Breart, B., Lemaître, F. & Bousso, P. Cutting Edge: Tumor-Targeting Antibodies Enhance NKG2D-Mediated NK Cell Cytotoxicity by Stabilizing NK Cell–Tumor

- Cell Interactions. *J. Immunol.* **189**, 5493–5497 (2012).
41. Bi, J. & Tian, Z. NK Cell Exhaustion. *Front. Immunol.* **8**, (2017).
  42. Wherry, E. J. T cell exhaustion. *Nat. Immunol.* **12**, 492–499 (2011).
  43. Blackburn, S. D. *et al.* Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat. Immunol.* **10**, 29–37 (2009).
  44. Wu, Z. *et al.* Human Cytomegalovirus-Induced NKG2Chi CD57hi Natural Killer Cells Are Effectors Dependent on Humoral Antiviral Immunity. *J. Virol.* **87**, 7717–7725 (2013).
  45. Oliviero, B. *et al.* Hepatitis C virus-induced NK cell activation causes metzincin-mediated CD16 cleavage and impaired antibody-dependent cytotoxicity. *J. Hepatol.* **66**, 1130–1137 (2017).
  46. Tang, C.-C. *et al.* Phenotypical and functional profiles of natural killer cells exhibiting matrix metalloproteinase-mediated CD16 cleavage after anti-HIV antibody-dependent activation. *Clin. Exp. Immunol.* **181**, 275–285 (2015).
  47. Liu, Q. *et al.* Matrix metalloprotease inhibitors restore impaired NK cell-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity in human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol.* **83**, 8705–8712 (2009).
  48. Makaryan, S. Z. & Finley, S. D. Modeling the stimulatory network in Natural Killer cells. *bioRxiv* 395756 (2019) doi:10.1101/395756.
  49. Wang, T. *et al.* Establishment and evaluation of a general dissociation technique for antibodies in circulating immune complexes. *Clin. Exp. Med.* **19**, 65–75 (2019).
  50. Lampertico, P. *et al.* EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.* **67**, 370–398 (2017).

## Figure Legends:

### **Figure 1: NK cell functionality is impaired in CHB patients**

(A) PBMCS from HD (n=30) or CHB patients (n=32) were co-cultured with K562 at a effector: target 1:1 ratio during 4 hours in presence of Golgi-Stop. PBMCS were then washed, stained and permeabilized before intracellular staining was performed. (B) PBMCS from HD (n=17) or CHB patients (n=17) were co-cultured with Rituximab coated Granta cells at a ratio 1:1 during 4 hours in presence of Golgi-Stop. PBMCS were then washed, stained and permeabilized and intracellular staining was performed. (C) PBMCS from HD (n=17) or CHB patients (n=17) were cultured with IL-12 (10 ng/mL) and IL-18 (10 ng/mL) during 4 hours in presence of Golgi-Stop. Data were acquired on a LSR Fortessa (BD Biosciences) and analyzed using Flow Jo software. \*\* : p-value < 0,05. n.s: non significant, NS: non stimulated

### **Figure 2: NK cell from CHB patients display an altered phenotype**

(A) NKaR expression was analysed by flow cytometry on total NK cells among PBMCS from HD or CHB patients. Seventeen HD samples and CHB were used for NKp46, DNAM-1 and LFA-1 extracellular staining whereas 30 HD samples and 32 CHB were stained for NKp30, CD16 and NKG2D. (B) NKiR expression were also

analysed by flow cytometry in PBMCS. Staining for NKG2A was performed on 17 HD and CHB samples and KLRG1, KIR3DL1, KIR3DL2/3 and CD160 were stained on 30 HD samples and 32 CHB. (C) Granzyme B (HD, n=30, CHB, n=32) and Perforin (HD, n=17 and CHB, n=17) intracellular staining was performed after PBMCS permeabilisation. (D) Extracellular staining of Tim-3, Lag-3 and PD-1 was performed on PBMCS from 30 HD samples and 32 CHB patients. TIGIT expression was analysed in 17 HD and 17 CHB patients. T-bet and Eomes intracellular staining was performed after PBMCS permeabilisation of 30 HD samples and 32 CHB and analysed on NK CD56<sup>dim</sup> cells. Mean fluorescence intensity (MFI) or the percentage of positive NK cells for the analysed marker is represented as indicated. Data were acquired on a LSR Fortessa (BD Biosciences) and analyzed using Flow Jo software. \*\*\*: p-value < 0,01 \*\* : p-value < 0,05. n.s: non significant.

### **Figure 3: Chronically activated phenotype marks NK cells from patients**

(A) PBMCS from HD or CHB patients were co-cultured with K562 at a 1:1 ratio during 4 hours in presence of Golgi-Stop. PBMCS were then washed and CD107a extracellular staining was performed. (B) PBMCS were thawed and incubated overnight at 4°C before CD16 staining. (C) PBMCS were thawed and incubated overnight at 4°C before extracellular staining for NK cells. Then PBMCS were washed, fixed and permeabilized using Lyse/Fix Buffer and Perm III buffer prior pErk intracellular staining. MFI of pErk is represented. Data were acquired on a LSR Fortessa (BD Biosciences) and analyzed using Flow Jo software. HD, n=30 and CHB, n=32. \*\*\*\*: p<0,0001, \*\*\*: p<0,005 \*\* : p-value < 0,05. n.s: non significant. (D) Linear regression plots showing the correlation between the basal level of CD107a and CD16 MFI, CD16 MFI and pErk MFI or basal level of CD107a and pErk MFI. The R<sup>2</sup> and p-value calculated by linear regression are indicated. (E) Linear regression plots showing the correlation between NKG2D MFI normalized with control and CD16 MFI, NKG2D normalized MFI and basal level of CD107a and NKG2D normalized MFI and pErk MFI. The R<sup>2</sup> and p-value calculated by linear regression are indicated.

### **Figure 4: mTOR activation is impaired in NK cells from patients**

(A) Frozen PBMCS from HD (n=30) or CHB patients (n=32) were thawed and incubated overnight at 4°C. PBMCS were then cultured with IL-15 at 100 ng/mL during 1 hour prior to extracellular staining for NK cells. PBMCS were then washed, fixed and permeabilized using Lyse/Fix Buffer and Perm III buffer prior pS6 Ser235/236, pAkt S473 and pSTAT5 intracellular staining. MFI of phosphorylated proteins are represented. (B) Extracellular staining of CD98 and CD71 on PBMCS from 30 HD and 32 CHB patients. SSC-A was also analysed in this experiment. PBMCS from 17 HD and 17 CHB patients were incubated with MitoSOX Red (5µM) and with Mitotracker Green (1µM) during 10 minutes at 37°C. The percentage of NK cells positive for both markers is presented. Data were acquired on a LSR Fortessa

(BD Biosciences) and analyzed using Flow Jo software. \*\* : p-value < 0,05. n.s: non significant.

### **Figure 5: Serum TGF- $\beta$ levels are elevated in CHB patients**

(A) Active TGF- $\beta$  levels were measured in serum samples from 30 HD and 32 CHB patients using a specific ELISA assay. \*\*\*: p<0,005. (B) Linear regression plots showing the correlation between basal pS6 MFI and active TGF- $\beta$  levels in patients.

### **Figure 6: Treatment with TGF- $\beta$ partly recapitulates exhausted phenotype**

(A) PBMCS from 5 HD were incubated with human recombinant TGF- $\beta$  at different concentrations during 4 days in presence of 10 ng/mL of human recombinant IL-15. PBMCS were then washed and stained. (B) PBMCS from 3 HD were incubated with human recombinant TGF- $\beta$  at different concentrations during 4 days in presence of 10 ng/mL of human recombinant IL-15. After 4 days, PBMCS were washed and co-cultured with K562 at a 1:1 ratio during 4 hours in presence of Golgi-Stop. PBMCS were then washed, stained and permeabilized before intracellular staining was performed. Data were acquired on a LSR Fortessa (BD Biosciences) and analyzed using Flow Jo software. The experiment has been performed four times. \*\* : p-value < 0,05. n.s: non significant, NS: non stimulated.

### **Table 1: Characteristics of patients and HD enrolled in the study**

## **Supplementary Figures**

### **Figure S1: HCMV status**

(A) The concentrations of IgG anti CMV antibodies were measured in serum from patients and HD to determine HCMV status. (B) The percentage of NKG2C+ adaptive NK cells in patients and HD was determined by flow cytometry and represented according to HCMV status.

### **Figure S2: Alterations in NK cell functionality do not result from CMV infection**

PBMCS from HD (n=30) or CHB patients (n=32) were co-cultured with K562 at a 1:1 ratio during 4 hours in presence of Golgi-Stop. PBMCS were then washed, stained and permeabilized before intracellular staining was performed. Data were acquired on a LSR Fortessa (BD Biosciences) and analyzed using Flow Jo software. HD were stratified according to the CMV status determined by serum anti CMV antibodies measurement. \*\* : p-value < 0,05. n.s: non significant, NS: non stimulated.

### **Figure S3: Gating Strategy**

Gating strategy used for flow cytometry analysis is presented here. First, lymphocytes through SSC and FSC analysis were selected. Then doublets were eliminated as well as dead cells. We then remove CD4<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup> and CD19<sup>+</sup> cells prior to gate on NK cells by CD56<sup>+</sup> and CD3<sup>-</sup> cells. CD7 marker was used to confirm the gating and NK bright and dim were then separated.

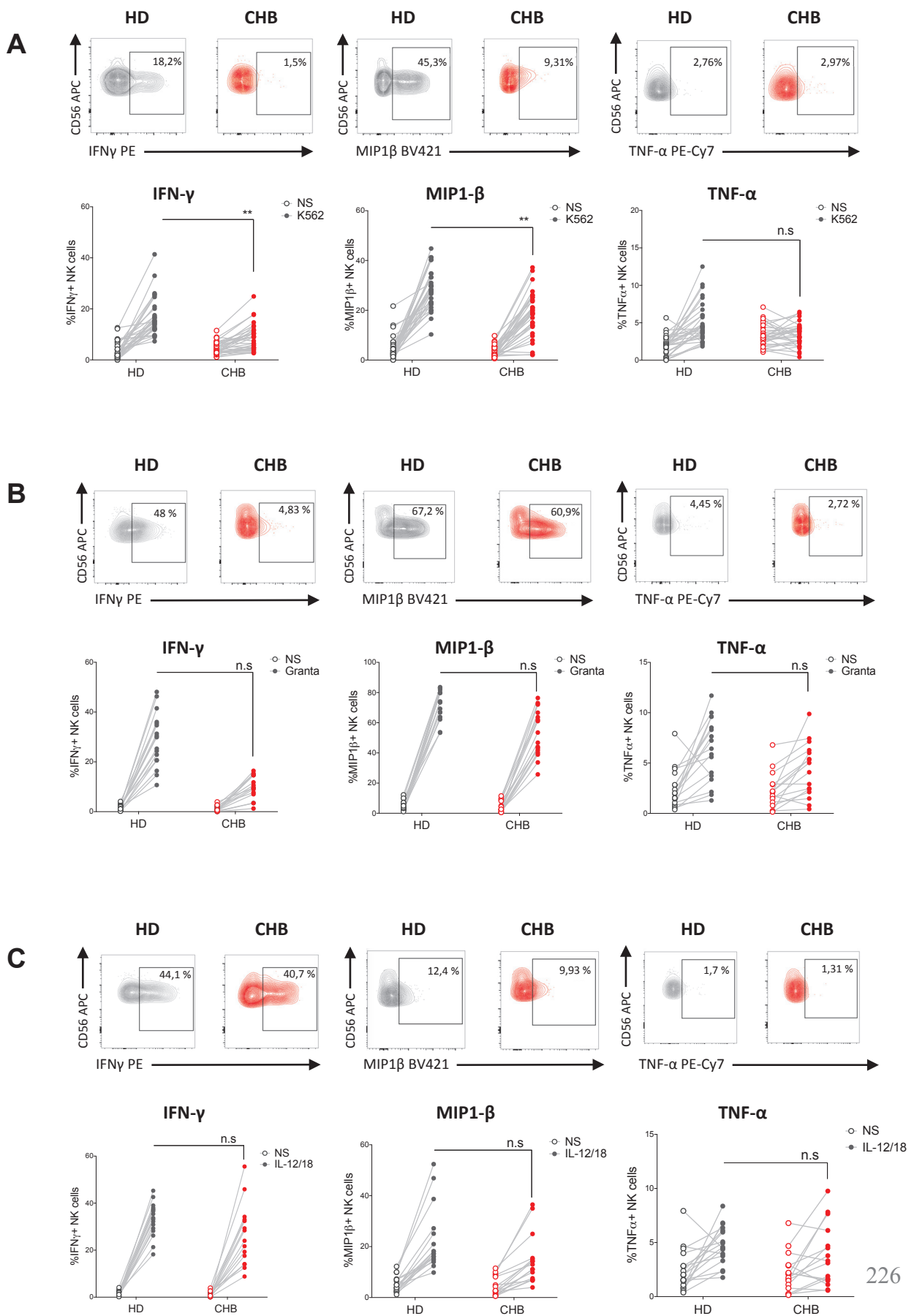
### **Table S1 : Antibodies used**

**Table 1**

<b>Parameter</b>	<b>CHB Patients</b>	<b>Healthy Donors</b>
Number	32	30
Age (y)		
Mean	39 +/- 13	38 +/- 13
Median (range)	38 (19-77)	36.5 (20-65)
Sex, n (%)		
Male	20 (62.5)	22 (73)
Female	12 (37.5)	8 (27)
HBV load (IU/mL)		
Median (range)	2844 (10-62,225)	/
HBsAg (IU/mL)		
Median	5770 (0.05-34,971)	/
ALAT (IU/mL)		
Median	20 (6-56)	NA
ASAT (IU/mL)		
Median	21 (11-34)	NA

*ALAT, serum alanine aminotransferase levels; ASAT, aspartate transaminase levels; NA, not available.*

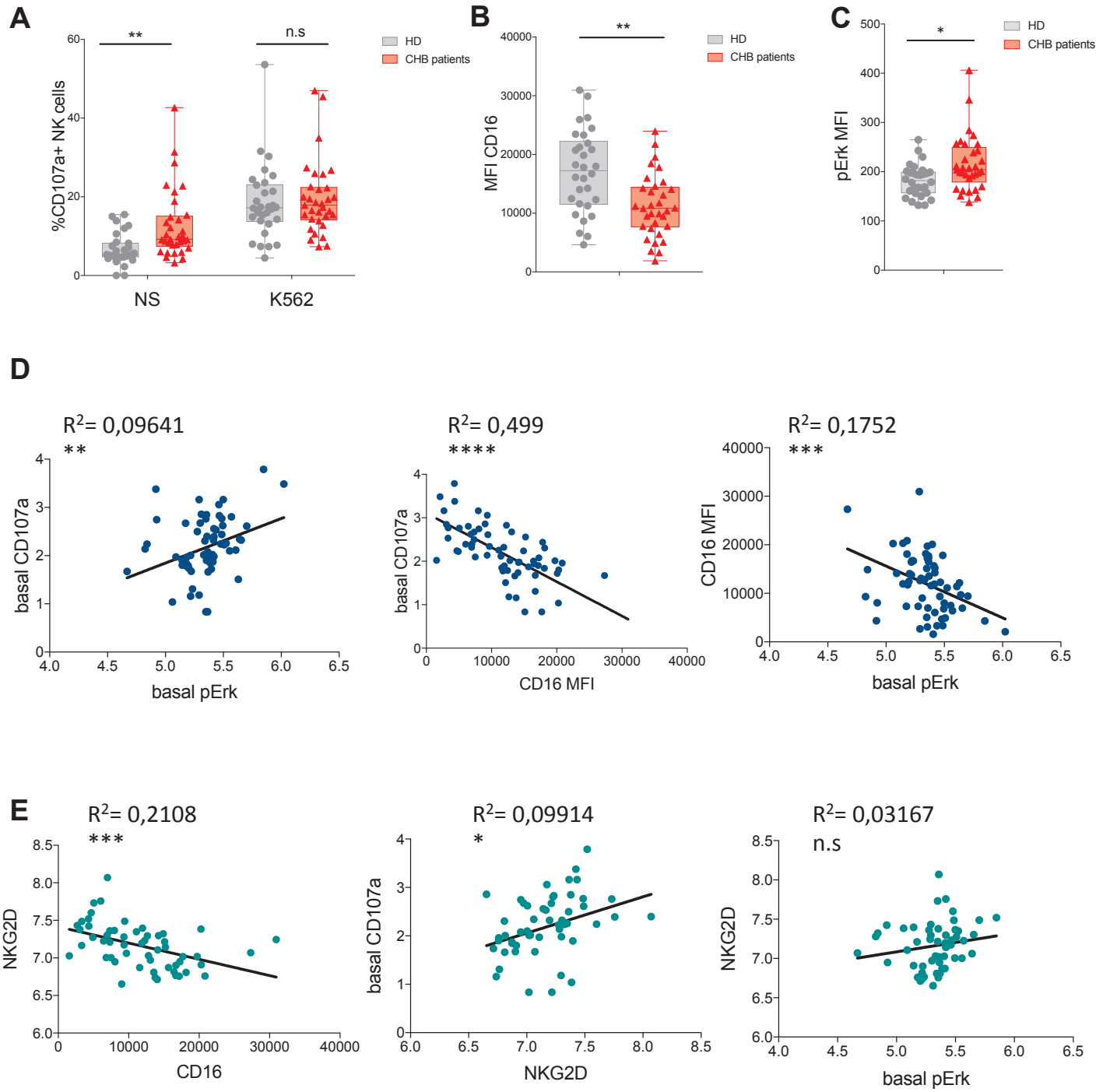
**Figure 1**



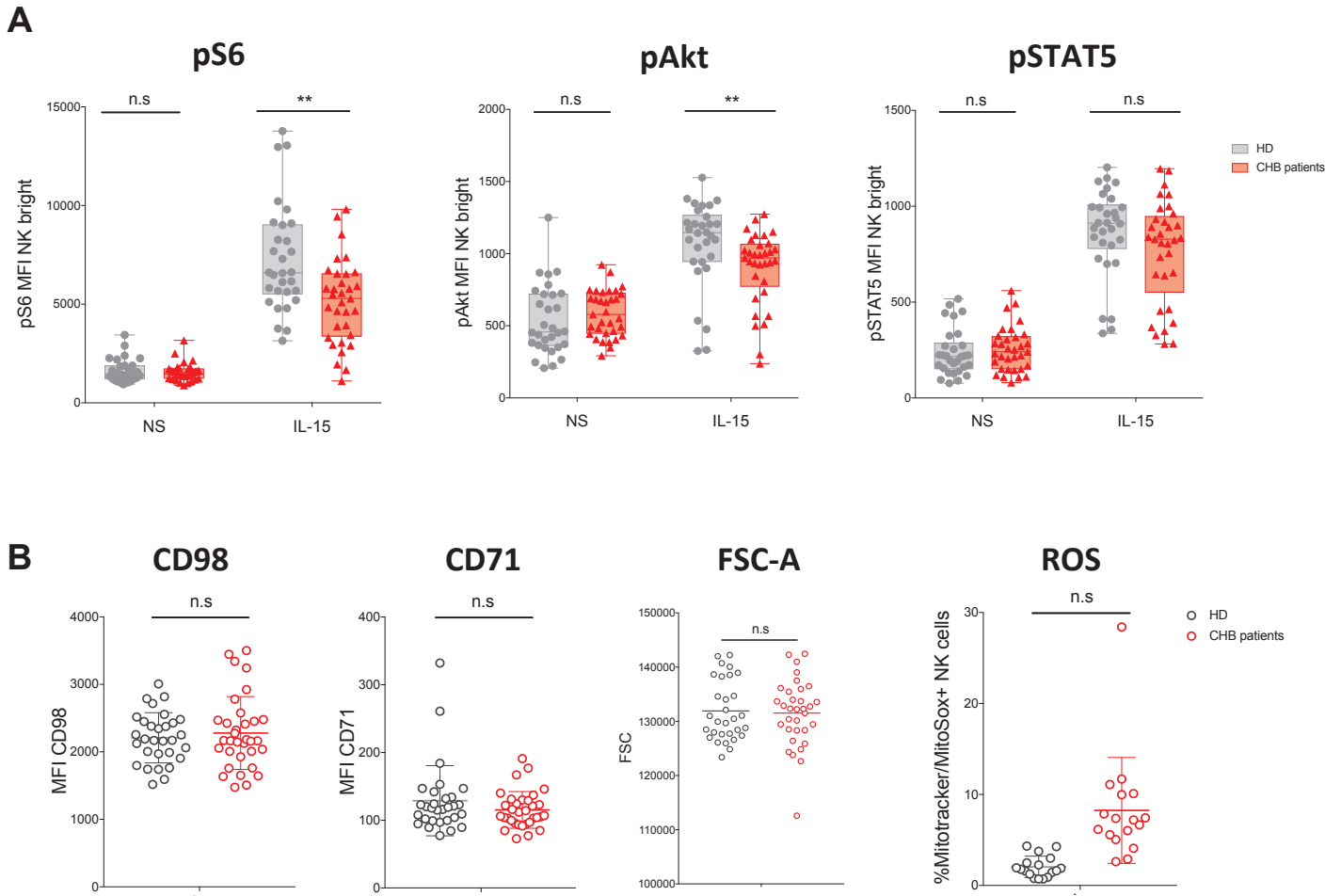




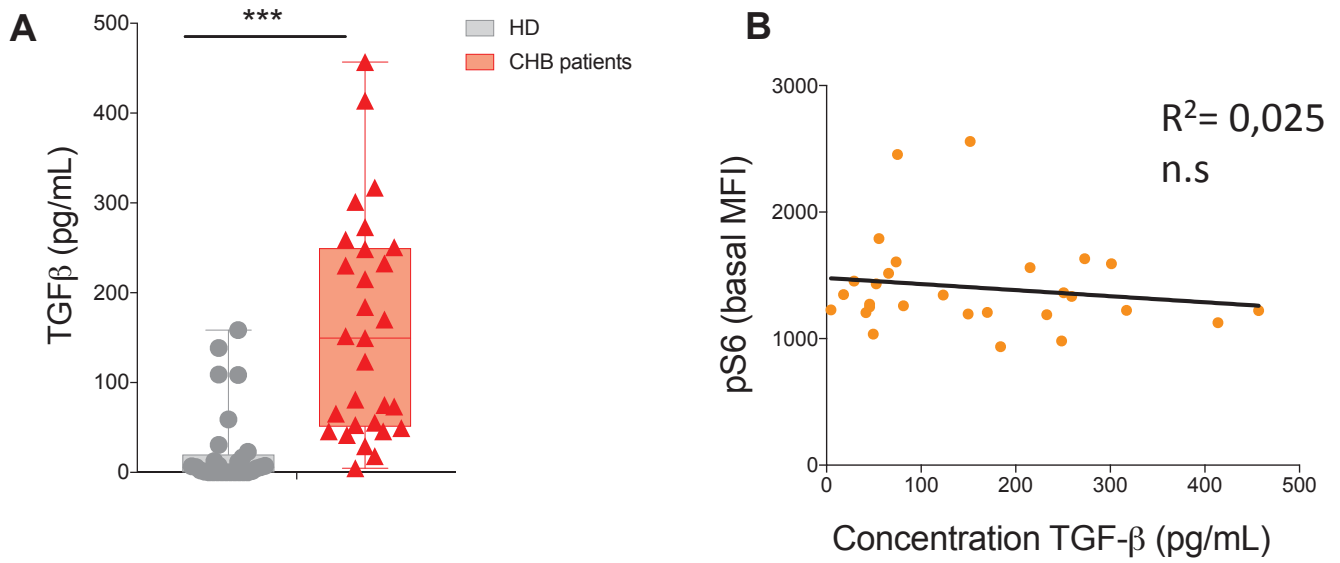
**Figure 3**



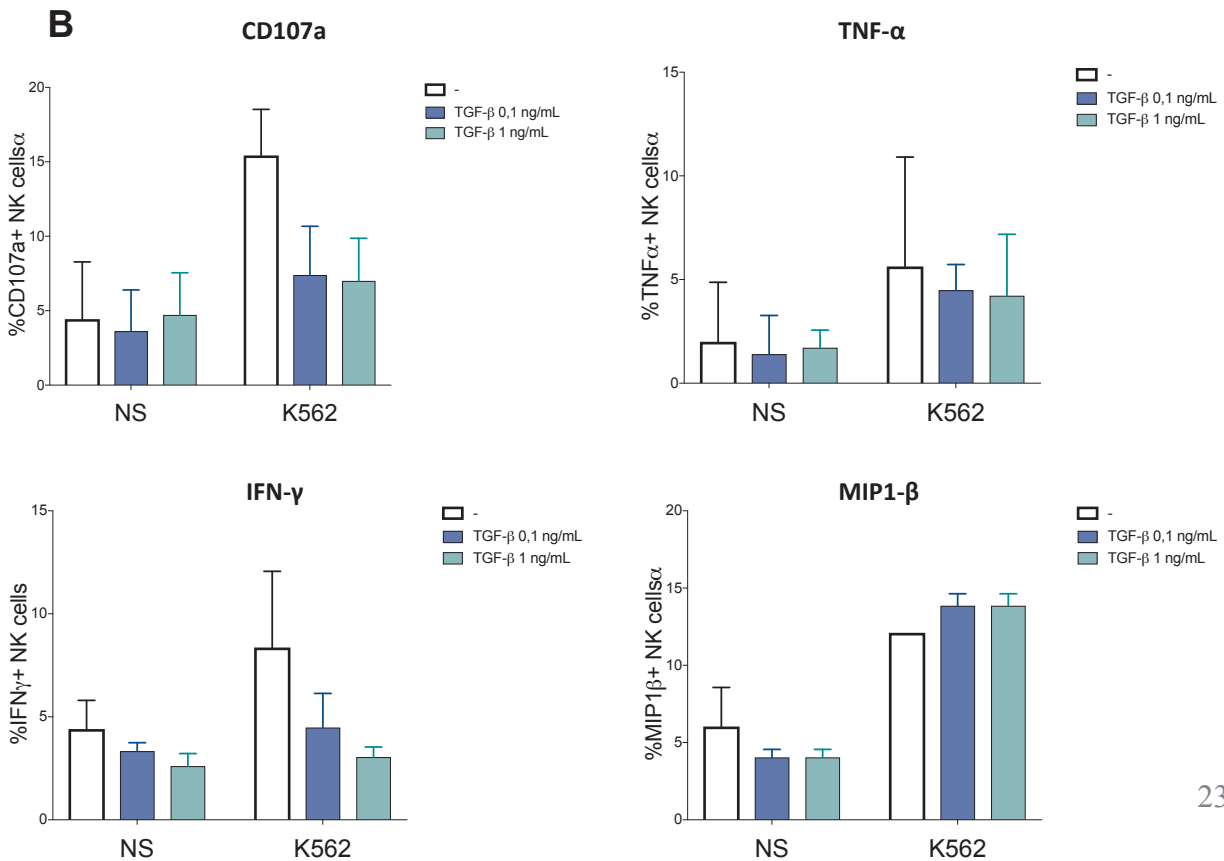
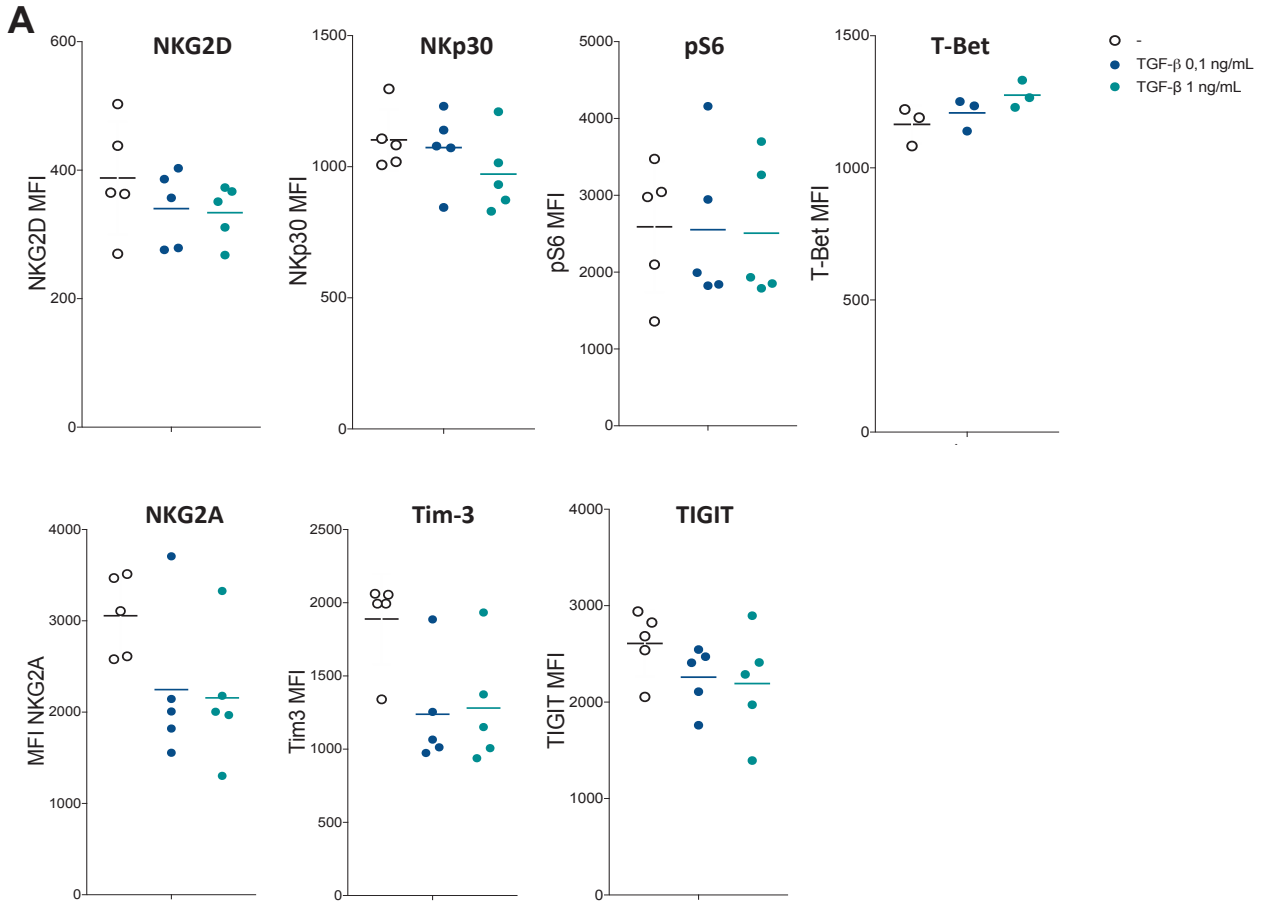
**Figure 4**



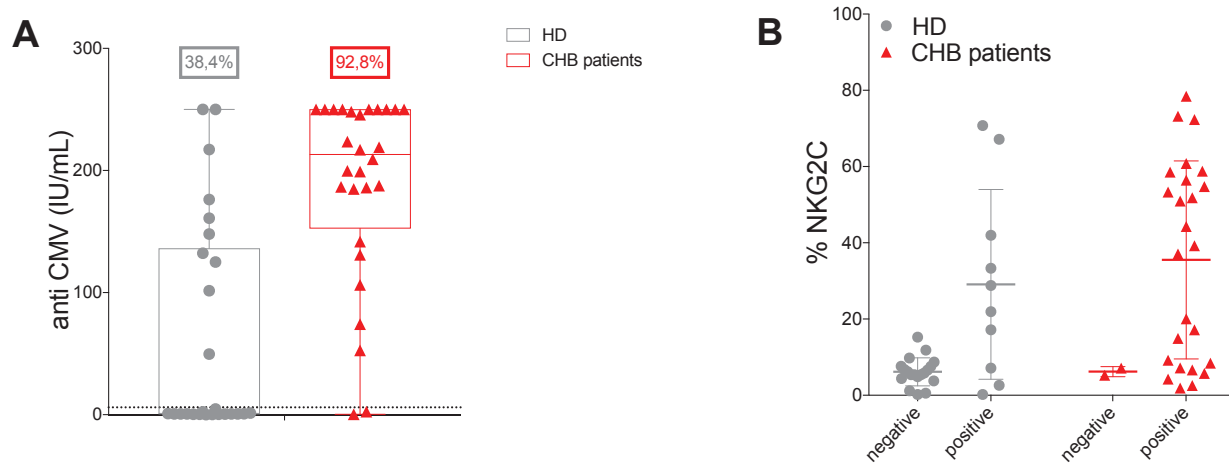
**Figure 5**



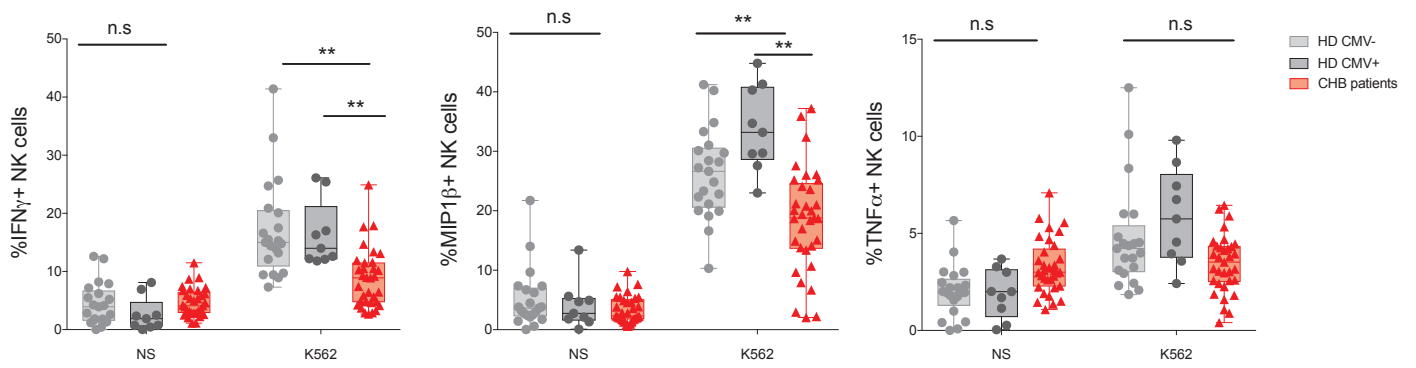
**Figure 6**



**Figure S1**



**Figure S2**



**Figure S3**

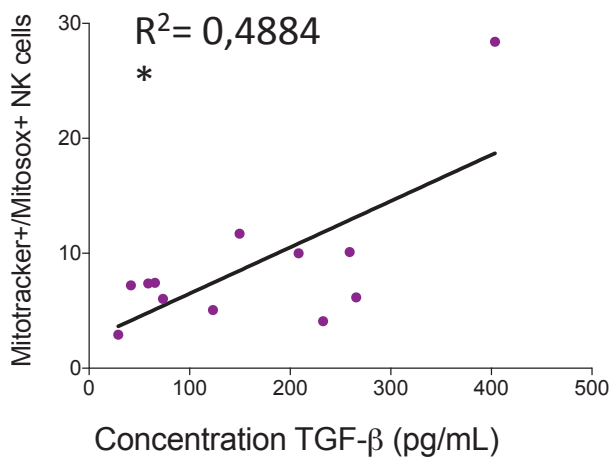
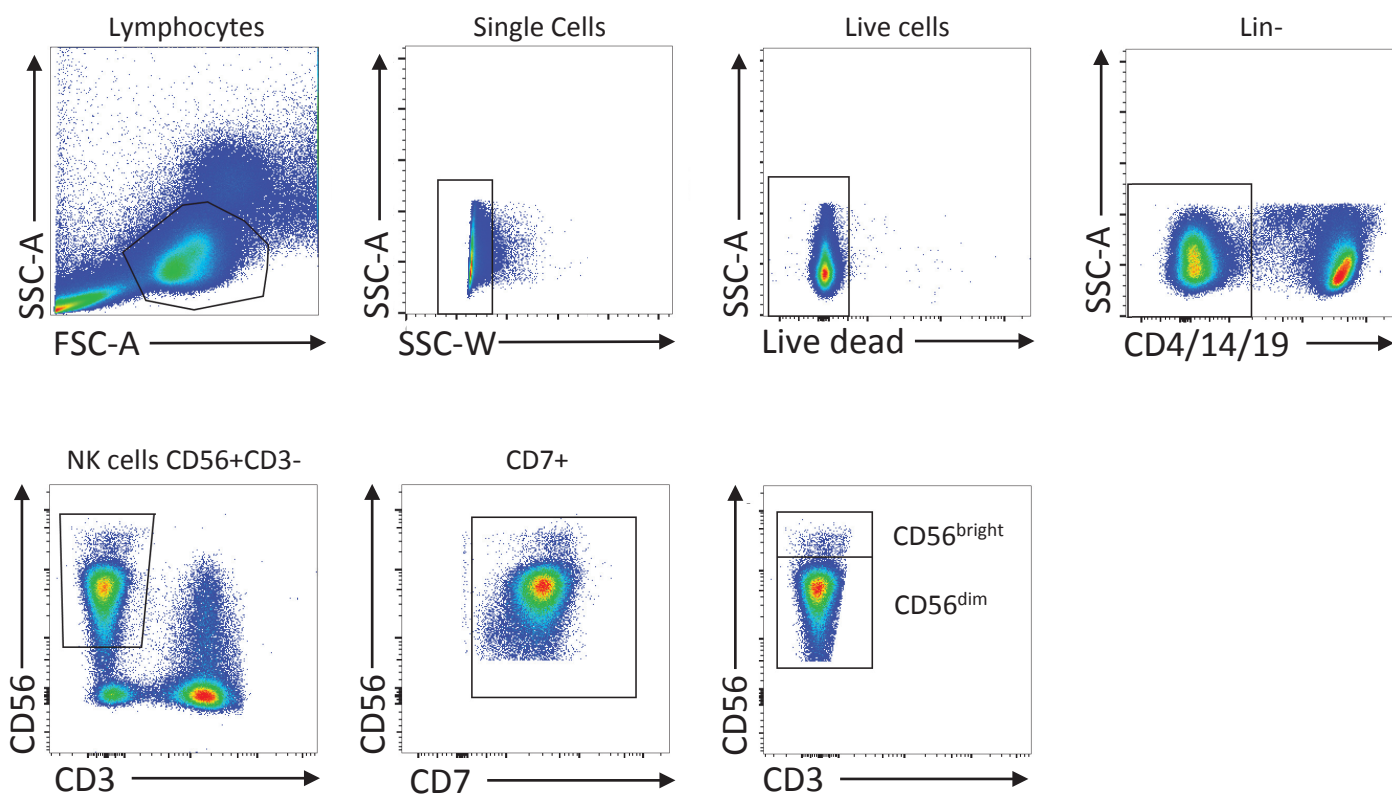


Figure S4



**Table S1.** Antibodies were obtained from ebioscience, BD Biosciences, Miltenyi, Beckman-Coulter, Cell Signaling Technology or Biolegend.

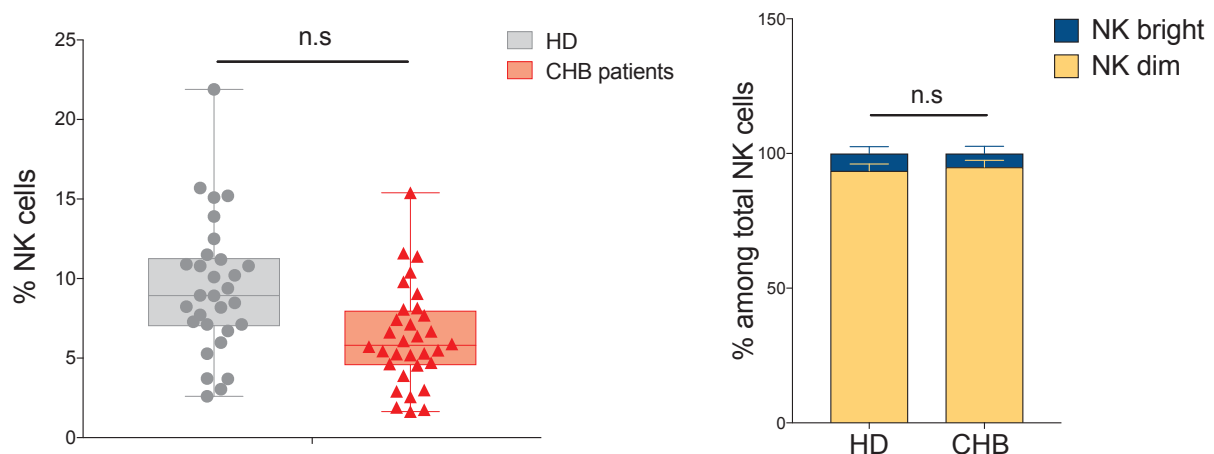
Human Antigen	Clone	Human Antigen/fluorochromes
2B4	2-69	2B4 PE
41BB	4B4-1	41BB BV421
CD107a	eBioH4A3	CD107a FITC
CD122	MIKBeta3	CD122 BB515
CD132	AG184	CD132 BV711
CD14	MoP9	CD14 PECF594
CD16	3G8	CD16 BV510
CD160	BY55	CD160 AF488
CD19	HIB19	CD19 PECF594
CD3	SK7	CD3 APC-Cy7
CD3	clone SK7	CD3 BV605
CD39	TU66	CD39 BV650
CD4	RPA.T4	CD4 PECF594
CD56	NCAM16.2	CD56 APC
CD56	AF127H3	CD56 PE Vio770
CD56	NCAM 16.2	CD56 BV786
CD57	NK-1	CD57 BV421
CD7	M-T701	CD7 BUV395
CD71	M-A712	CD71 BV421
CD98	UM7F8	CD98 PE
DNAM-1	DX11	DNAM-1 BV605
Eomes	WD1928	Eomes PerCP ef710
FCeRg	FCABS400F, Millipore	FceRG FITC
Granzyme B	GB11	Granzyme B AF700
IFNg	4SB3	IFNg PE
KI67	SolA15	KI67 AF647
KIR2DL2/3	DX7	KIR2DL2/3 PEVio770
KIR3DL1	DX9	KIR3DL1 PEVio770
KLRG1	2F1	KLRG1 BV510
Lag3	3DS223H	Lag 3 PE Cy7
LFA-1	mAb 24, Hycult Biotech	LFA1 biotine
MIP1b	D21.13.51	MIP1b v450
NKG2A	REA110	NKG2A PE Vio770
NKG2C	134591, R&D Systems	NKG2C PE
NKG2D	1D11	NKG2D BV650
NKp30	p30-15	Nkp30 BV510
NKp46	9.E2	NKp46 AF700
pAkt S473	M89-61	pAkt PE S473
PD-1	EH12.1	PD-1 BV786
Perforin	dG9	Perforin BV421
pERK (pT202/pY204)	20A	pERK AF488 (pT202/pY204)
PLZF	Mags.21F7	PLZF PE
pNFKB Ser529	K10/895.12.50	pNFKB Ser529 PECF594
pS6 (pS235/236)	D57.2.2E or D52.2.2E	pS6 (pS235/236) PB
pSTAT5 (pY694)	47/Stat5(pY694)	pSTAT5 PerCPCY5.5 (pY694)
PYK2 (pY402)	L68.12.56.272	PYK2 (pY402) AF647
T-Bet	O4-46	T Bet BV711
TIGIT	MBSA43	TIGIT PerCPef710
Tim-3	7D3	Tim 3 BB515
TNFa	mAb 11	TNFa PE Cy7



## 2.3.2 Résultats complémentaires de l'article 2

### a- Nombre de cellules circulantes NK bright et NK dim

Plusieurs études ont montré que le nombre de cellules NK circulantes peut être affecté chez les patients CHB (Oliviero et al., 2009; Sun et al., 2012). D'autres encore suggèrent que le pourcentage relatif des deux populations NK CD56<sup>bright</sup> et NK CD56<sup>dim</sup> peut être modifié (Peppia et al., 2010). Néanmoins, ceci n'a pas été validé dans notre cohorte où nous n'avons pas observé de différence en termes de nombre total de cellules NK ou de répartition (NK bright vs NK dim) (Figure 58) malgré une tendance à la diminution concernant le pourcentage de cellules NK totales. L'analyse statistique que nous avons réalisée ne nous permet pas d'établir cette différence comme significative.



**Figure 58: Nombre de cellules NK et répartition en sous types**

Le nombre de cellules NK totales circulantes parmi les PBMC a été examiné chez 30 HD et 32 patients CHB. La population NK a été définie après marquage anticorps comme CD3-CD56+ (gauche) et analyse en cytométrie de flux. La répartition entre les sous-types CD56<sup>bright</sup> et CD56<sup>dim</sup> est présentée sous forme d'histogramme (droite). n.s : non significatif.



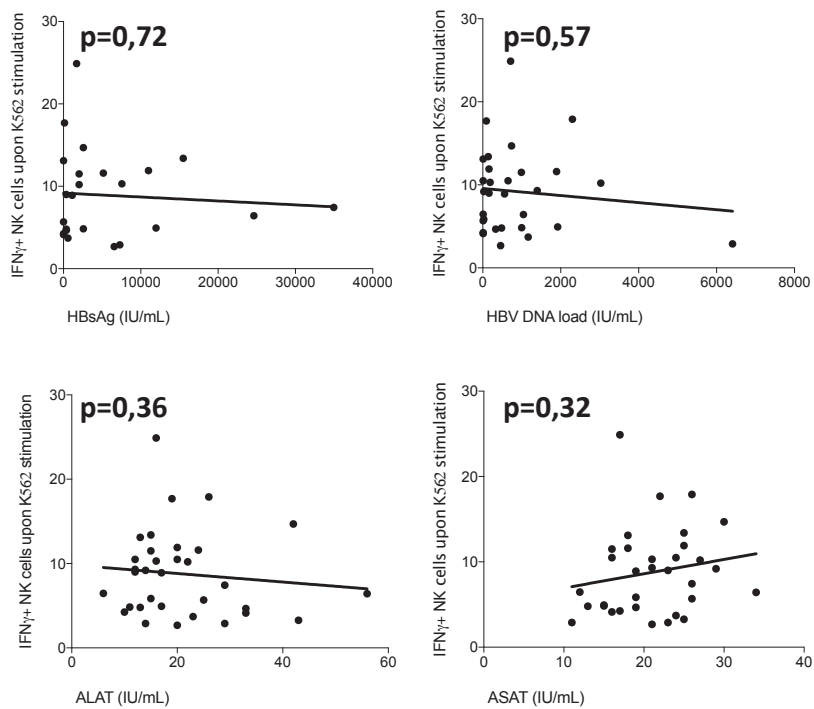
## **b- Causes possibles de la perte de fonction des cellules NK chez les patients**

Comme nous l'avons vu dans l'introduction de ce manuscrit, différentes causes et mécanismes moteurs de l'épuisement peuvent être impliqués. Les données provenant de l'étude de la cohorte HBV<sup>+</sup> suggèrent que dans ce contexte, la perte de fonctionnalité des cellules NK est associée à des dérégulations dans les voies moléculaires Erk et mTOR. De plus, nous avons pu identifier un rôle partiel du TGF- $\beta$  qui est notamment connu pour bloquer l'activation de mTOR. Cependant afin de tester d'autres causes possibles nous avons mesuré plusieurs paramètres chez les patients chroniquement infectés.

### - Exposition chronique à l'antigène

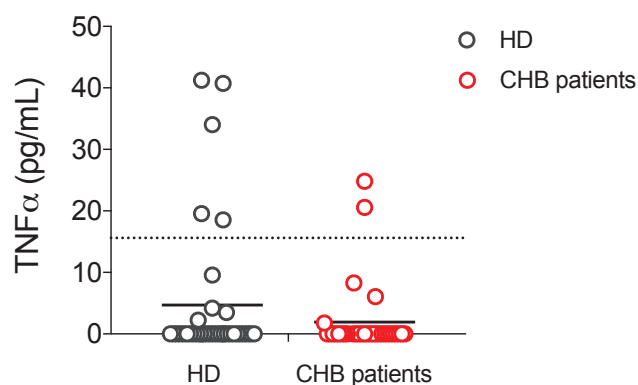
Les patients chroniquement infectés par le VHB sont soumis à des taux importants d'antigène HBsAg. Ces taux peuvent être très variables chez les patients. En effet, dans notre cohorte, le minimum observé est de 0,05 IU/mL mais peut s'élever jusqu'à 34 000 IU/mL avec une médiane à 2560 IU/mL. De même, bien que les patients étudiés soient en phase inactive, la charge virale (nommé HBV DNA load) n'est pas nulle et a été mesurée dans cette cohorte. D'autres paramètres cliniques sont également disponibles tels que les taux d'ALAT/ASAT reflétant les niveaux d'inflammation et les dommages hépatiques dus à la réponse immunitaire. Ainsi, nous avons recherché si des corrélations existaient entre ces différents paramètres (HBsAg, HBV DNA load et ALAT/ASAT) et la perte de fonctionnalité des cellules NK (**Figure 59**). Cependant, nous n'avons pas pu établir de corrélations significatives.

Finalement, différentes matrices de corrélations possibles, à partir des mesures réalisées dans l'étude, ont été établies par Omran Allatif du service BIBS du CIRI. Nous avons articulé l'étude des corrélations autour de quatre thématiques : les paramètres cliniques des patients, le phénotype des cellules NK, la fonctionnalité des cellules NK, et les voies de signalisation mesurées. Seules les corrélations significatives sont présentes dans ce manuscrit (cf Article 2).



**Figure 59: Corrélations entre les paramètres cliniques et la fonction des cellules NK**

Le pourcentage de cellules NK positives pour l'IFN- $\gamma$  parmi les PBMC après 4 heures de co-culture avec des cibles K562 à un ratio 1 : 1 a été analysé par cytométrie de flux et corrélé par régression linéaire aux taux d'antigène HBs (HBsAg), à la charge virale (HBV DNA load) et aux niveaux d'ALAT/ASAT mesurés chez les patients lors d'examen de routine.



**Figure 60: Mesure du taux de TNF- $\alpha$  sérique**

Les taux de TNF- $\alpha$  présent dans le sérum de 30 HD et 32 patients CHB ont été analysés par ELISA. Le seuil de détection du test ELISA est représenté sur le graphique par une ligne en pointillé. Les différences ne sont pas significatives.

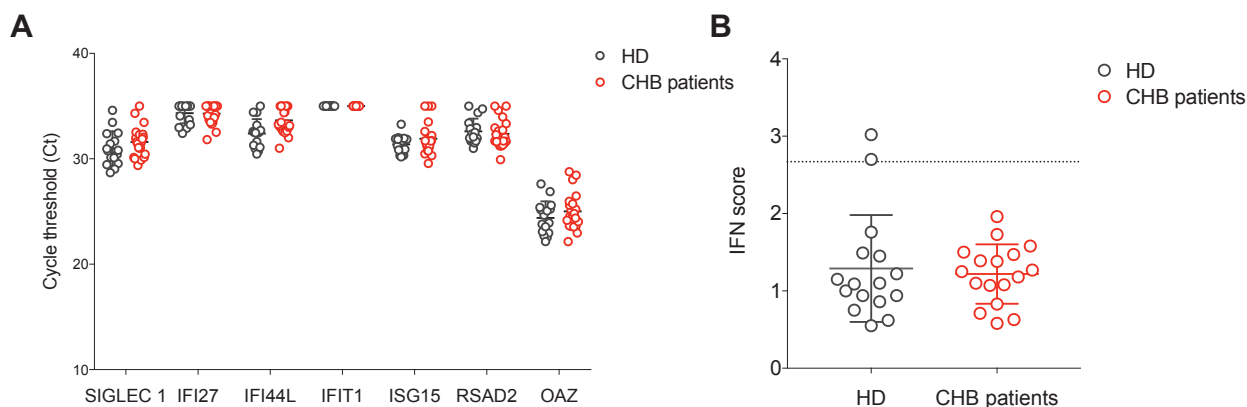
- Exposition chronique à des cytokines pro-inflammatoires

Une autre cause possible de l'épuisement est l'exposition chronique aux cytokines pro-inflammatoires. Nous avons donc tout d'abord mesuré les niveaux de TNF- $\alpha$  dans le sérum des 30 HD et des 32 patients CHB par ELISA (Figure 60). Aucune différence significative n'a été mise en évidence. De plus, les mesures se trouvent en dessous du seuil de détection du test ELISA utilisé pour la plupart des échantillons.

Les IFN de type I ( $\alpha/\beta$ ) peuvent également être responsables d'une stimulation chronique. Cependant, les niveaux très faibles de ces cytokines, qui peuvent être de l'ordre du femtogramme, rendent leur détection difficile et nous ne disposons pas d'un analyseur de type Simoa permettant leur mesure fine. En revanche, dans l'équipe, nous avons développé un test spécifique permettant d'établir un score IFN via la technique de PCR quantitative (qPCR). Ce score est basé sur un calcul prenant en compte l'expression de six gènes induits par l'IFN (ISG, « interferon stimulated gene ») : SIGLEC 1, IFI27, IF44L, IFIT1, ISG15, et RSAD2. Deux gènes sont utilisés comme contrôle, GAPDH et Actine. Par analyse de l'expression de ces gènes dans les PBMC de patients atteints de maladies auto-immunes de type lupus, nous pouvons définir un seuil à partir duquel nous considérons que le score est positif. L'expression de ces gènes ne varie pas entre les patients et les donneurs sains (Figure 61A). Par ailleurs, le score calculé est négatif (inférieur au seuil) à la fois pour les donneurs sains et pour les patients (Figure 61B). Ces deux types de cytokines (TNF- $\alpha$  et IFN de type I) ne sont donc pas impliqués dans la perte de fonction des cellules NK.

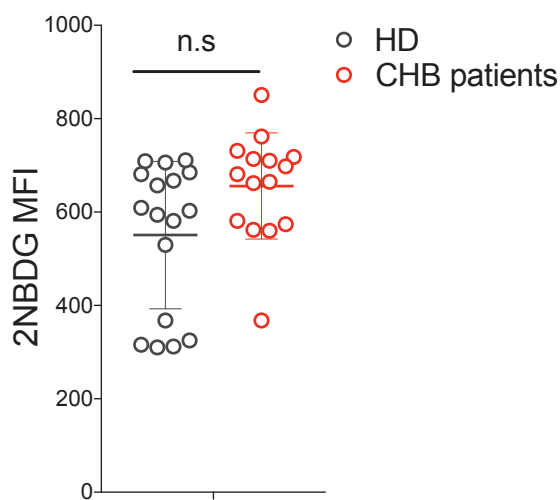
- Altérations au niveau du métabolisme

Comme nous l'avons décrit dans l'article, nous avons pu mettre en évidence des altérations au niveau du métabolisme (baisse d'activité de mTOR et mitochondries produisant plus de ROS) dans les cellules NK de patients. Le glucose étant un nutriment essentiel pour la fonction des cellules NK, nous avons examiné si la prise de glucose par ces cellules est modifiée entre les patients et les donneurs sains (Figure 62). Pour répondre à cette question, la sonde fluorescente 2NBDG qui est un analogue fluorescent du glucose a été utilisée et testée sur 17 patients CHB et 17 HD. Il n'existe cependant pas de différence entre les patients et les donneurs (Figure 62).



**Figure 61: Mesure du score IFN**

(A) L'ARN des PBMC des différents patients a été extraits et rétro-transcrits en ADN complémentaire (ADNc) puis le cycle seuil (Ct) pour chaque des gènes a été mesuré par qPCR (B) Le score IFN a été calculé et représente la médiane des variations entre les Ct de chaque gène et les Ct théoriques mesurés à partir d'un échantillon standard. Le seuil au-delà duquel le score est positif est représenté sur le graphique par une ligne en pointillé.

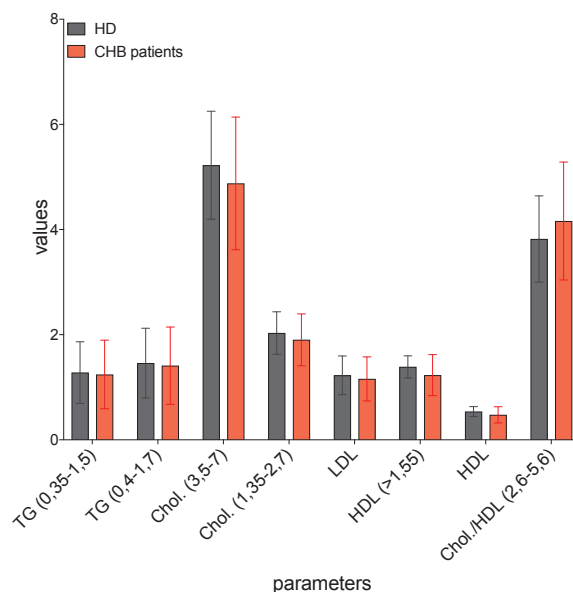


**Figure 62: Analyse de l'import de glucose par les cellules NK**

Les PBMC de 17 patients CHB et de 17 HD ont été décongelées puis incubées à 4°C sur la nuit. Elles ont ensuite été incubées à 37°C en présence de la sonde fluorescente 2NBDG pendant 10 min dans du milieu RPMI supplémenté en SVF. n.s : non significatif.

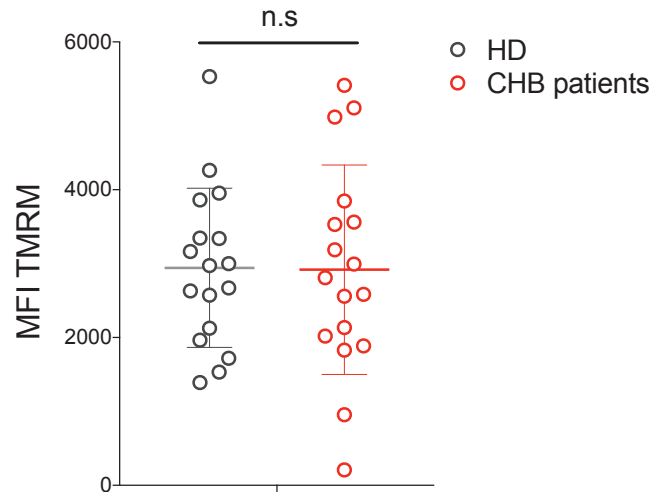
Afin de déterminer si d'autres changements dans les métabolites disponibles peuvent en partie expliquer les défauts observés, le bilan lipidique des patients a été établi grâce à une collaboration avec le CHU de Lyon Sud et comparé entre les échantillons de sérum de 17 patients et de 17 donneurs sains (Figure 63). Cependant, pour ces mesures non plus, nous n'avons pas observé de différence entre les patients et les donneurs sains analysés.

De plus, l'état des mitochondries semble altéré et certaines publications ont mis en évidence l'existence de mitochondries dépolarisées dans les cellules épuisées, notamment dans les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. Dans le but d'analyser une possible dépolarisation, nous avons utilisé un colorant fluorescent, le TMRM (pour tetramethylrhodamine methyl ester perchlorate) qui permet la mesure du potentiel mitochondrial en s'accumulant dans la mitochondrie en proportion de l'intensité du  $\Delta\psi$  (Figure 64). Cette sonde n'a pas permis de souligner de défaut de polarisation. Enfin, nous souhaitons analyser la forme et la structure des mitochondries chez les patients par microscopie électronique. Les échantillons ont été préparés et pris en charge par une plateforme spécifique d'imagerie qui effectuera leur analyse.



### Figure 63: Comparaison du bilan lipidique

Le bilan lipidique a été obtenu par collaboration avec le CHU de Lyon Sud et les différents paramètres indiqués ont été analysés par mesure de routine.



**Figure 64: Analyse du potentiel mitochondrial**

Les PBMC de 17 patients CHB et de 17 HD ont été décongelées puis incubés à 4°C sur la nuit. Elles ont ensuite été incubées à 37°C en présence de la sonde fluorescente TMRM pendant 30 min dans du milieu RPMI supplémenté en SVF. n.s : non significatif.

### c- Matériel et méthodes complémentaires

#### **Mesure des niveaux de TNF- $\alpha$**

Les niveaux de TNF- $\alpha$  ont été mesurés par ELISA selon les recommandations du kit Human TNF-alpha quantikine ELISA (R&D systems).

#### **Mesure du score IFN**

L'extraction d'ARN des PBMC a été réalisée à l'aide du kit RNA and protein extraction (Macherey Nagel) et l'ARN total a été quantifié au Nanodrop. L'ADNc a été synthétisé à partir de 1 $\mu$ g d'ARN total en utilisant le kit SuperScript VILO cDNA synthesis et un Master Mix (Invivogen). Les qPCR ont été réalisées en plaque 96 puits par utilisation du kit FastStart Universal SYBR Green Master Rox (Roche). Les courbes standards ont été préparées pour chaque gène et générées par une dilution en série de 10X dans le but de déterminer l'efficacité de chaque amorce. Nous avons étudié 6 ISG qui font parties des plus exprimés chez les patients AGS : SIGLEC 1 (sialic acid binding Ig like lectin), IF27 (interferon alpha inducible protein 27), IFI44L (interferon induced protein 44 like), IFIT1 (interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 1), ISG15 (interferon stimulated gene 15) et RSAD2 (radical S-adenosyl methionine domain containing 2). L'expression de chaque gène a été calculée en utilisant la formule suivante :  $E^{-\Delta Ct}$  et l'expression des ISG a été normalisé à la moyenne géométrique de l'expression des 2 gènes de ménages : GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) et  $\beta$ -Actin.

## **Tests métaboliques**

1x10<sup>6</sup> PBMC ont été incubées dans du milieu RPMI+10% SVF avec la sonde fluorescente Tetramethylrhodamine, Methyl Ester, Perchlorate (TMRM) (ThermoFisher) à 25 nM pendant 30 minutes à 37°C ou avec la sonde 2-NBDG (ThermoFischer) à 100 µM pendant 10 minutes à 37°C avant d'être immunomarquées pour détecter les cellules NK. Les données ont ensuite été acquises sur un LSR Fortessa (Becton-Dickinson) et analysées par l'utilisation du logiciel FlowJo 10.5.0.

## **Bilan lipidique**

Pour quantifier les acides gras (AG), les lipides ont été extraits du sérum à l'aide d'un mélange chloroforme / méthanol (1: 1, v / v), selon la méthode de Folch. L'extrait a été lavé avec une solution saline pour éliminer les protéines. La phase chloroformique a été concentrée sous un flux d'azote et dissoute dans un mélange chloroforme / méthanol (2:1, v / v). Les classes de lipides ont été séparées par chromatographie en couche mince sur des plaques de gel de silicium 60 (Merck, Allemagne) en utilisant de l'éther diéthylique, de l'éther de pétrole et de l'acide acétique comme solvants de développement. Le bleu de bromophénol a été pulvérisé sur les plaques et les bandes individuelles de phospholipides et d'esters de cholestéryle ont été séparées dans des tubes distincts. La fraction phospholipidique a été saponifiée et transméthylée avec du méthylate de sodium, et la fraction ester de cholestéryle a été méthylée avec de l'acide sulfurique et du méthanol déshydraté. Les esters méthyliques de chaque fraction ont été concentrés sous un flux d'azote, dissous par de l'hexane et analysés par chromatographie gaz-liquide.

Le système de chromatographie en phase gazeuse (GC Trace Ultra, ThermoFisherScientific, Les Ulis, France) était équipé d'une colonne capillaire en silice fondue SP® 2380 (diamètre interne de 60 mx 0,25 mm) recouverte de 100% de cyanosiloxane et utilisait de l'hélium comme gaz vecteur. Pour l'élution des acides gras, la température initiale était de 100°C pendant une minute, puis de 40°C / min jusqu'à 175°C maintenue pendant 10 minutes, 2°C / min jusqu'à 225°C maintenue pendant 1 minute, 5 °C / min jusqu'à 235 °C maintenu pendant 20 minutes.

L'identification des acides gras d'ester méthylique individuels a été réalisée en comparant les temps de rétention avec ceux des valeurs standards. Les résultats ont été exprimés en pourcentage de la surface totale de tous les pics de FA dans chaque fraction lipidique et quantifiés en mg/L en tant que rapport de la surface de FA multiplié par la quantité d'étalon interne multipliée par le facteur de réponse de la surface d'étalon interne. La quantification et le pourcentage de FA dans chaque fraction ont été déterminés à l'aide du logiciel ChromCard (ThermoFisherScientific, Les Ulis, France). L'acide diheptadécanoyl a été utilisé comme étalon interne (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France).

### 3- Discussion

Au cours de ces travaux de thèse, nous nous sommes intéressés aux défauts fonctionnels des cellules NK qui surviennent en contexte de stimulation chronique. De nombreuses observations décrivent une perte de fonctionnalité de ces cellules dans la littérature, tant pour des modèles murins que chez l'homme, en contexte infectieux (Li et al., 2013; Mavilio et al., 2005; Sun et al., 2012; Zhang et al., 2017) ou tumoral (Ardolino et al., 2014; Guillerey et al., 2015; Mamessier et al., 2011; Ohs et al., 2017; Paul et al., 2016; Peng et al., 2017; Rocca et al., 2013; Seo et al., 2017a; Zhang et al., 2018b).

Cette perte de fonction s'apparente à l'épuisement tel qu'il est défini dans les LT CD8<sup>+</sup>. Cependant, on ne sait toujours pas à ce jour si un tel processus existe réellement pour les cellules NK. Il est clair que ce processus existe pour les LT en contexte infectieux comme cela a pu être démontré au cours de l'infection LCMV (Wherry, 2011) mais il est moins évident et moins bien défini dans les situations de cancer et l'est encore moins pour les cellules NK. Ce processus est-il commun aux différentes pathologies ? Les dérégulations survenant dans les voies moléculaires sous-jacentes sont-elles similaires ? Est-il caractérisé par une signature transcriptionnelle spécifique ? Est-il réversible ?

Une des raisons qui explique le manque de données est l'absence d'un modèle adéquat pour l'étude des mécanismes de la perte de fonction des cellules NK. En effet, trois modèles sont couramment employés. Le premier est basé sur l'étude de la lignée tumorale de mélanome B16F10 (Gao et al., 2017; Takeda et al., 2011; Zhang et al., 2018b). Cependant, les cellules B16 ne sont que très faiblement immunogènes vis-à-vis des cellules NK. Ainsi, elles n'activent pas ou peu les cellules NK *in vitro* (nos données non publiées).

Le deuxième modèle utilise les cellules de lymphome RMA-S (Ardolino et al., 2014; Diefenbach et al., 2001; Hsu et al., 2018). Ce modèle est plus immunogène pour les cellules NK du fait de la faible expression des molécules de CMH-I. D'autre part, la lignée parentale RMA qui n'active pas les cellules NK peut être utilisée en contrôle. Néanmoins, une des limites de ce modèle est que la diminution du niveau



d'expression de CMH-I est variable, la température étant notamment un facteur impliqué dans cette variation (Ljunggren et al., 1991) ce qui est difficilement maîtrisable en cours d'expérience. De plus, les cellules RMA-S expriment toujours partiellement les molécules de CMH-I. Enfin, le troisième modèle utilise un panel d'autres tumeurs déficientes pour le CMH-I, mais dont les interactions avec les cellules NK sont moins bien caractérisées. On peut noter par exemple les lignées cellulaires de cancer mammaire 4T1, de cancer de la prostate RM-1, ou encore de cancer du côlon CT26 (Gao et al., 2017; Ohs et al., 2017; Seo et al., 2017a; Zhang et al., 2018b). Dans ces modèles, les cellules NK ne semblent cependant pas être les seuls effecteurs impliqués, ce qui complique l'interprétation des résultats.

Enfin, la plupart des études précédentes ont utilisé des tumeurs solides, issues de l'injection sous cutanée de ces lignées. Cependant, les tumeurs solides ne sont infiltrées que par un faible nombre d'effecteurs. La quantité de matériel disponible est donc très faible. C'est donc un point technique majeur. Nous l'avons d'ailleurs confirmé dans le modèle d'injection des RMA-KR en sous-cutané (Figure 36 et 37). Un autre point que l'on peut souligner est que, dans ces modèles de tumeurs solides, l'analyse des cellules NK est permise lorsque la tumeur est palpable (*ie* pour le modèle RMA-S, à partir du jour 7 (Ardolino et al., 2014)) et ne permet donc pas des mesures très précoces post injection, c'est à dire à un moment où les défenses innées sont supposées être les plus importantes.

### **1- Modèle RMA-KR : forces et faiblesses**

Partant de ces constats, nous avons donc tout d'abord cherché à développer un modèle murin plus adapté et permettant notamment de stimuler chroniquement les cellules NK et d'analyser les modifications au cours du temps. Notre choix s'est porté sur les RMA pour différentes raisons. Les cellules RMA, qui sont CMH-I positives n'activent pas les cellules NK et sont facilement modifiables génétiquement. Elles constituent un contrôle approprié puisqu'une tumeur est présente (ce qui génère de l'inflammation et la mise en place d'un microenvironnement tumoral (TME)) mais cette tumeur n'est pas reconnue par les cellules NK. Par ailleurs, c'est un lymphome, type de cancer qui est une cible classique des cellules NK (Chiossone et al., 2018; Mundy-Bosse et al., 2018). Dès lors, nous avons généré la lignée RMA-KR. Les

deux lignées de lymphome RMA et RMA-KR qui ne diffèrent que par l'absence d'expression du CMH-I et par l'expression de Rae1- $\beta$ , ont été injectées par voie intraveineuse et conduisent à l'établissement de tumeurs notamment dans la rate où elles sont en contact avec un important réservoir d'effecteurs. Ceci permet d'ailleurs de pouvoir analyser une grande quantité de cellules NK au contact des ces tumeurs. Comparée aux RMA, la croissance des RMA KR dans la rate est retardée suggérant qu'elles sont contrôlées par les cellules NK. Ce retard est associé à une meilleure survie des souris (cf Article 1, Figure 1D).

Les expériences de déplétion des cellules NK montrent l'impact sur la pousse des RMA KR et prouvent que le système est bien NK-spécifique. La spécificité de l'anticorps PK136 (anti NK1.1) utilisé pour les déplétions peut être discutée mais les résultats ont été confirmés dans les expériences utilisant des souris déficientes pour les voies perforine et IFN- $\gamma$  et pourront l'être dans des souris génétiquement déficientes en cellules NK (comme les souris NKp46-DTR par exemple, (Walzer et al., 2007a)). De plus, nous avons également déplété les lymphocytes T CD8 et CD4 et nous n'avons pas observé d'impact sur la pousse des RMA ou des RMA-KR (Article 1, Figure S1B). Enfin, l'implication des NKT pourrait être débattue. Cependant, les RMA n'expriment que des niveaux très faibles de la molécule CD1d, un analogue des molécules du CMH-I et nécessaire à la reconnaissance par le TCR invariant des NKT (Smyth et al., 2000a).

**L'apport du modèle RMA KR est donc multiple : 1- ce modèle est NK spécifique, c'est à dire que le rejet est dépendant des cellules NK, 2- il est fortement immunogène vis à vis des cellules NK et induit donc une stimulation chronique forte et 3- la quantité de matériel disponible est importante et permet de réaliser de nombreux tests de sortie.** Ce modèle permet ainsi d'étudier la désensibilisation des cellules NK dans une situation pathologique et vient compléter les données obtenues par approche génétique dans un contexte non-inflammatoire (souris *B2m<sup>-/-</sup>*) (Guia et al., 2011; Joncker et al., 2010; Marçais et al., 2017) .

Bien qu'apportant de nouvelles possibilités, ce modèle présente tout de même, certaines limites. Premièrement, les tumeurs RMA et RMA-KR diffèrent *in vivo* pour l'expression de certains ligands (SLAMF5 par exemple parmi ceux testés) sans qu'il

soit possible de le contrôler (Figure 30). De même, la dérive qui peut survenir en culture n'est pas maîtrisable. Un autre problème auquel nous avons été confrontés est la différence dans le délai de pousse. Cette différence fait que le stade terminal (entre les conditions RMA et RMA KR) est atteint plus tôt par les souris injectées avec les cellules RMA que par celles injectées avec les cellules RMA KR (Article 1, Figure 1D). Par conséquent, les expériences ont, pour la plupart, été réalisées à des jours différents. L'ajout de souris contrôles à chaque point de cinétique nous a permis de normaliser et de comparer des expériences effectuées à des jours différents. D'autre part, afin d'homogénéiser les groupes du point de vue cinétique, nous avons choisi d'injecter une forte dose de cellules ( $5 \times 10^7$  cellules). Ce nombre est, certes, élevé et n'est pas physiologique mais il faut souligner que nous obtenons les mêmes résultats avec des doses inférieures ( $5 \times 10^6$  ou  $5 \times 10^5$ ), les groupes sont simplement plus hétérogènes ce qui complique la mise en place des expériences. Par ailleurs, naturellement, aucune tumeur chez l'homme ne contient 100% de cellules immunogènes pour les cellules NK. On observe au contraire un mélange de cellules CMH-I positives et de cellules ayant perdues l'expression de ces molécules (Garrido et al., 2017).

Il est également essentiel de souligner l'importance de la charge tumorale présente dans la rate au moment des expériences. En effet, les expériences sont, pour la plupart, réalisées aux jours 12, 13 ou 14 pour la condition RMA-KR ce qui correspond aux stades terminaux. Néanmoins, il arrive que la cinétique soit décalée et que la charge tumorale reste faible dans la rate à ces jours. Ainsi, pour une meilleure compréhension de l'épuisement, il est important de corréliser les données obtenues dans les différentes expériences avec la charge tumorale. Ceci est valable essentiellement pour les souris RMA-KR ; car en effet, les souris RMA ont toujours une charge tumorale importante (>1 million) au stade terminal (J9 pour cette condition) sans que celle-ci ne réduise significativement les fonctions effectrices.

Enfin, et c'est la limite majeure de notre modèle, la tumeur ne pousse pas seulement dans la rate mais colonise aussi d'autres organes (Article 1, Figure 3B). Les tumeurs RMA et RMA KR sont donc fortement disséminées. Des analyses de la pousse des tumeurs RMA dans des souris sauvages et des tumeurs RMA-KR dans des souris déplétées en cellules NK, révèlent tout d'abord que les deux types de tumeurs n'ont pas de tropisme particulier.

En présence de cellules NK, les cellules tumorales RMA KR sont d'abord retrouvées dans le foie et dans les poumons, puis dans le cerveau et la moelle osseuse et enfin dans le sang et la rate. Les souris injectées avec des RMA ou des RMA KR présentent d'ailleurs des signes de paralysie, notamment des membres inférieurs aux stades terminaux. Ceci pourrait être la conséquence de la présence de métastases dans le cerveau et dans la moelle osseuse (compression de la moelle épinière). En outre, nous avons observé que la perte de fonctions des cellules NK au niveau de la rate survient aux stades terminaux (Figure 39 et Article 1, Figure 6A) et précède seulement de quelques heures la mort de la souris. Rétrospectivement, nous pensons que la mort de la souris est dissociée des capacités fonctionnelles des cellules NK de la rate. Elle est en réalité liée à l'apparition de ces métastases distantes dans les différents organes, ce qui diminue les paramètres vitaux des animaux. Il est donc essentiel de distinguer survie des animaux et épuisement des cellules NK/pousse tumorale dans la rate.

Ainsi, étudier l'épuisement dans la rate apparaît compliqué dans notre modèle puisque cet épuisement ne survient qu'aux stades terminaux et juste avant que la souris ne meure. Il est possible qu'une survie prolongée de l'animal permette l'apparition d'un épuisement plus poussé. Pour pallier à ce problème, des stratégies d'amélioration peuvent être envisagées :

- injections intra-spléniques :

D'un point de vue anatomique, lorsque l'on injecte les cellules dans la veine caudale, elles atteignent de manière simultanée les différents organes (rate, foie, poumon etc..) (Wang et al., 2016), y établissant des métastases. Une façon de limiter la croissance tumorale dans les autres organes serait donc d'injecter directement les cellules tumorales dans la rate. Il faut encore vérifier la faisabilité de ce type d'injections et sa capacité à réduire le nombre de métastases, dans le foie notamment. Dans ce contexte, il faut noter que certaines données de la littérature suggèrent que les injections en intra-splénique sont justement très efficaces pour obtenir des modèles métastatiques au niveau du foie (Lee et al., 2014). D'autre part, il est également possible dans notre modèle que nous perdions les cellules tumorales au niveau de la rate, puisqu'elles seraient probablement efficacement éliminées par les cellules NK.

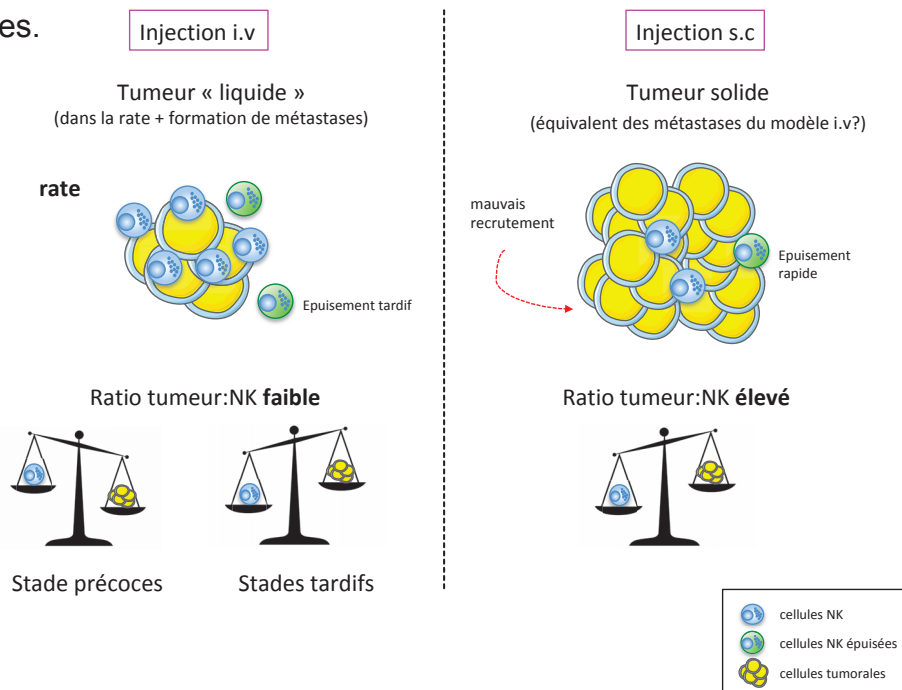
### - transfert de cellules NK

Nous pourrions également imaginer transférer des cellules NK épuisées dans des souris naïves, qui seront ensuite injectées avec des cellules tumorales. Ceci permettrait de prolonger la stimulation chronique avec une deuxième vague de stimulation.

### -continuum avec le modèle s.c :

A l'inverse du modèle i.v, les tumeurs solides sont constituées d'une majorité de cellules tumorales et d'un nombre très faible de cellules immunitaires infiltrées, ce qui est associé à un épuisement très important des cellules NK dès lors que la tumeur est détectable (Ardolino et al., 2014).

Ainsi, nous proposons deux modèles d'études pour la suite : le modèle i.v dans la rate permettant d'analyser le processus d'épuisement aux temps précoces et le modèle s.c pour l'étude des temps plus tardifs (Figure 65). Un continuum entre les deux semble exister et nous permettrait probablement d'étudier l'épuisement aux différents stades.



**Figure 65: Comparaison des modèles i.v et s.c**

L'injection i.v des cellules RMA KR conduit à la formation de tumeurs disséminées dans la rate et dans d'autres organes établissant des métastases par exemple dans le foie. Dans ce modèle le stade « épuisement » survient tardivement, lorsque le ratio tumeur:NK s'inverse et penche en faveur de la tumeur. A l'inverse, le modèle s.c ne permet pas l'étude de l'épuisement aux stades précoces mais uniquement lorsque la tumeur solide est détectable. Les cellules NK infiltrant peu les tumeurs solides et sont épuisées rapidement par la charge virale très importante.

## 2- Quand et comment les cellules NK contrôlent-elles la croissance des RMA KR ?

### - Quand ?

Il semblerait que les cellules NK ont un rôle très précoce dans l'élimination des tumeurs comme le démontre les déplétions à différents temps, elles jouent un rôle dans les premières 72h et le fait de les ôter ensuite n'a que très peu de conséquences sur la survie et la pousse tumorale (Article 1, Figure 2C, 3A et 4B). **Leur rôle est extrêmement important dans les heures qui suivent l'injection, ils contrôleraient donc l'étape d'initiation.**

En revanche, de manière extrêmement contre-intuitive, retirer les cellules NK à des stades plus tardifs est favorable pour la pousse tumorale. En effet, si l'on déplete les cellules NK après le jour 10, la pousse tumorale s'accélère et ce, d'autant plus que la déplétion est tardive (Figure 31). Ainsi, au moment du sacrifice (fixé dans notre expérience à jour 20), la charge tumorale était la plus forte dans les groupes de souris déplétés en cellules NK les plus tardivement. Ces résultats sont valables pour les deux organes testés à savoir la rate et le foie. Il est difficile de tirer une conclusion claire de ces résultats. Après un certain stade, les cellules NK jouent-elles un rôle pro-tumoral ? Dans ce cas, la charge tumorale devrait être plus élevée dans le groupe non déplété, or ce n'est pas le cas. Une autre explication pourrait être que les cellules tumorales sont sélectionnées au cours du processus d'immuno-édition, mais reste globalement contrôlées par les cellules NK qui limitent leur pousse. Si l'on enlève ce frein en supprimant les cellules NK, alors la tumeur, qui est de plus en plus agressive, va croître de manière exponentielle sans être ralentie. Ces points mériteront d'être éclaircis dans de prochaines études. L'échappement de la tumeur n'est pas dû à une réacquisition du CMH-I, ni à une perte de Rae1- $\beta$  et à la sélection de variants CMH-I positifs/Rae1- $\beta$  négatifs puisqu'aux stades terminaux, seul un faible pourcentage de cellules tumorales (en moyenne de l'ordre de 5-15%) ré-exprime le CMH et a perdu l'expression de Rae1- $\beta$  (Article 1, Figure S3). Cependant, nous ne pouvons pas exclure d'autres mutations subies par pression de sélection qui conduiraient à la sélection de variants plus agressifs qui prolifèrent plus rapidement, par exemple, (Martincorena et al., 2017; Nicholson and Cimini, 2013). Si ce sont les cellules qui prolifèrent le plus rapidement qui sont sélectionnés, alors elles peuvent

être contenues tant que les cellules NK sont présentes mais poussent beaucoup plus rapidement dès que le contrôle est retiré. Pour le tester, il serait intéressant d'isoler les cellules RMA KR aux stades terminaux par tri en cytométrie en flux, de séquencer leur ADN génomique et de comparer les résultats au séquençage de cette lignée cultivée *in vitro*. Par ailleurs, les cellules RMA-KR qui se sont multipliées *in vivo* sont-elles toujours capables de stimuler les cellules NK ? Pour répondre à cette question, nous allons tester la capacité des cellules RMA-KR à re-stimuler des cellules NK naïves *in vitro* après leur passage *in vivo*. Le but sera ensuite de réaliser la même expérience mais sur des lignées issues d'hôtes déplétés en cellules NK. Les cellules NK semblent donc contrôler la tumeur tout au long de la croissance, en tous cas dans la rate.

- Comment ?

Dans notre modèle, les deux voies d'action des cellules NK (ie système perforine/granzyme (cytotoxicité) et production d'IFN- $\gamma$ ) sont nécessaires au contrôle de la tumeur (Article 1, Figure 2A). La perte des capacités cytotoxiques semble avoir un impact légèrement plus fort que la suppression de l'IFN- $\gamma$  sur la croissance tumorale. Ceci s'oppose à ce qui a été montré pour les B16 où seul l'IFN- $\gamma$  est indispensable (Takeda et al., 2011).

Comme nos résultats montrent que la double modification « KR » entraîne un rejet des RMA par les cellules NK, nous avons ensuite testé quel signal était le plus efficace pour induire l'activation des cellules NK : absence de CMH-I ou ligand activateur. Le test de sortie utilisé a été la pousse tumorale. Pour répondre à cette question, nous disposons des lignées RMA-Rae1- $\beta^+$  et RMA-KO qui, *in vitro*, activent de manière équivalente les cellules NK, à un niveau intermédiaire entre les cellules RMA et les cellules RMA-KR. Après injection *in vivo*, on peut noter que la survie des souris injectées avec les cellules RMA-Rae1- $\beta^+$  est similaire aux souris RMA. Les cellules RMA-Rae1- $\beta^+$  ne semblent donc pas contrôlées contrairement aux cellules RMA-KO pour lesquelles la survie des souris est retardée. Ces données semblent indiquer que le signal « soi manquant » (absence de CMH-I) est nécessaire pour le contrôle par les cellules NK alors que le signal « soi induit » (Rae1- $\beta$ ) n'est



pas suffisant. De surcroît, la présence des deux signaux (condition RMA-KR) permet un meilleur contrôle que le signal « absence de CMH » seul.

En résumé, nos données montrent que la lignée RMA-KR est contrôlée *in vivo* mais finit par échapper aux cellules NK, démontrant que l'immunosurveillance par les cellules NK s'affaiblit au fil du temps et ne permet pas d'éliminer la tumeur, bien que le délai de pousse soit retardé.

### 3- Comment expliquer la croissance tumorale dans le modèle RMA KR?

#### - Dans la rate :

En ce qui concerne la rate, la cinétique de croissance tumorale, semble récapituler le concept des 3E (Dunn et al., 2002): avec une phase d'élimination (Elimination) précoce, puis une période qui s'apparente à une phase d'équilibre (Equilibrium) au cours de laquelle les cellules tumorales ne poussent pas ou peu et enfin une phase de croissance (Escape) où la tumeur prend le dessus et surpasse les défenses NK (Article 1, Figure 3A). Comment expliquer cette phase d'échappement ? Est-ce dû à 1) une perte de fonction (de l'épuisement ?) des cellules NK et qui explique que la tumeur s'emballe dans la rate, ou 2) une vitesse de pousse supérieure au contrôle, ce qui submergerait les défenses.

#### 1) Perte de fonction des cellules NK (épuisement)

Dans notre première hypothèse, la tumeur conduirait à l'épuisement des cellules NK au niveau de la rate et pourrait donc ensuite croître de façon non contrôlée. La perte de fonctionnalité des cellules NK de la rate serait la conséquence d'un contact prolongé avec leurs cibles. On s'aperçoit qu'il y a la fois un effet de la stimulation persistante (au cours du temps) avec l'obtention de cellules NK « épuisées », ou du moins dysfonctionnelles, à des stades tardifs (même si la charge tumorale n'est pas considérablement élevée selon les expériences) mais également un effet du nombre de cellules tumorales présentes. Le ratio NK/cibles s'inverse alors en faveur de la tumeur (Figure 39 et Article 1, Figure 6B). Ceci rejoint les connaissances acquises lors de l'étude de l'épuisement T dans le modèle LCMV : l'épuisement est fonction de la durée de stimulation par l'antigène (Bucks et al., 2009; Shin et al., 2007) mais



aussi de la charge virale (Mueller and Ahmed, 2009; Utzschneider et al., 2016). De façon analogue, dans notre modèle, l'épuisement dépend de la capacité des cellules tumorales à stimuler les cellules NK (pas ou peu d'épuisement en condition RMA). Par ailleurs, l'épuisement observé est plus prononcé si le ratio effecteur/cible dans la rate devient inférieur à 1 (plus de cellules cibles que d'effecteurs NK). La perte de fonction est donc dépendante de l'immunogénicité de la tumeur et de la charge tumorale. Elle est graduelle et suit la progression tumorale ; il y a donc une notion de stade comme cela avait été montré dans des travaux sur le modèle Kras de cancer du poumon (Cong et al., 2018).

La fonction la plus touchée est la production d'IFN- $\gamma$ , et nos résultats ne permettent pas de conclure sur une perte hiérarchisée car la fonction de cytotoxicité ne semble pas affectée (Figure 41). En effet, *ex vivo* les cellules NK issues de souris RMA-KR à des temps tardifs sont toujours capables de dégranuler et de tuer des cibles YAC-1 ou RMA-KO. Il est possible que la perte de fonctions cytotoxiques survienne dans un deuxième temps. D'autre part, dans le modèle d'injection en s.c de cellules RMA-S, les deux fonctions des cellules NK (production d'IFN- $\gamma$  et dégranulation) sont affectées (Ardolino et al., 2014). Il en est de même pour le modèle MC38 de carcinome du côlon par exemple (Seo et al., 2017a). Cependant, dans ces modèles, les cellules NK sont au contact d'un nombre beaucoup plus important de cellules tumorales comme nous l'avons vu (Figure 36). A l'inverse, dans notre modèle de tumeur dans la rate, le nombre de cellules tumorales est faible et explique peut-être que la fonction de cytotoxicité n'est pas encore affectée.

Quoi qu'il en soit, si la perte des fonctions cytotoxiques existe, les souris meurent avant qu'on ne puisse l'observer.

## 2) Vitesse de pousse supérieure au contrôle exercé par les cellules NK

Dans notre deuxième hypothèse, le contrôle des cellules NK s'exerce mais les cellules prolifèrent rapidement et prennent le dessus sur les cellules NK. Cette vitesse de croissance accrue pourrait être expliquée par la sélection de variants qui cyclent plus vite.

Cette deuxième hypothèse est liée à la première puisque la tumeur peut également prendre le dessus en induisant de l'épuisement.

Quoi qu'il en soit, afin de mieux expliquer les interactions NK-cellules tumorales ainsi que la pousse de la tumeur, nous avons fait le choix de développer un modèle mathématique en collaboration avec le Dr Fabien Crauste (Institut de Mathématiques de Bordeaux, UMR5251). Cette modélisation pourrait permettre de clarifier les liens qui existent entre le nombre de cellules NK dans les différents organes, le nombre de cellules tumorales dans ces mêmes organes et leur évolution respective au cours du temps. Les données préliminaires issues de la modélisation mathématique révèlent que les cellules NK contrôlent bien la pousse des RMA KR mais que le processus d'épuisement ne semble pas nécessaire pour expliquer l'échappement. D'autres données devront être implémentées pour améliorer le modèle, basé jusqu'ici sur le nombre de cellules tumorales dans la rate et le nombre de cellules NK correspondant. Pouvoir déterminer le nombre de cellules NK « épuisées » serait un atout majeur mais nos analyses ne permettent pas, pour l'instant, de distinguer un marqueur clé.

- Dans les autres organes :

L'analyse macroscopique des organes révèle la présence de métastases dans le foie comme nous l'avons présenté dans l'article 1 (Article 1, Figure 4A). Ces métastases sont présentes sous la forme de nodules blancs de différentes tailles et qui semblent détachés du reste du foie. Ces métastases sont identifiées à des stades tardifs et lorsque la dose injectée est de  $5 \times 10^6$  cellules RMA KR. A une dose plus importante ( $5 \times 10^7$  cellules), nous n'avons pas observé de nodule blanc à la surface du foie mais l'aspect de l'organe est modifié : sa coloration est plus claire et il présente d'innombrables petites tumeurs blanches, difficilement délimitables les unes par rapport aux autres. Cet aspect est similaire pour les deux doses avec la lignée RMA, cas où la tumeur pousse très rapidement dans le foie. Nous pensons qu'à la plus faible dose de cellules RMA-KR, seul un faible nombre de cellules tumorales échappent au contrôle NK et établissent des nodules de taille importante en échappant à l'élimination par le système immunitaire. A contrario, à plus forte dose, un nombre plus important de cellules colonisent rapidement l'organe, ce qui aboutit à la formation de foyers métastatiques plus nombreux, en compétition les uns avec les autres. Une autre possibilité serait que les cellules tumorales qui ont échappé aux défenses immunitaires tuent la souris avant l'apparition de ces nodules. Il est

d'ailleurs connu que la dissémination de cellules métastatiques dans des organes distants de la tumeur primaire se produit très précocement dans la maladie (López-Soto et al., 2017). Ces cellules distantes persistent longtemps et précèdent la formation de métastases volumineuses, qui correspondraient dans notre cas aux nodules observés.

Les nodules ont été isolés et leur analyse révèle un très faible infiltrat immunitaire et notamment très peu de cellules NK (de l'ordre de 0,5%, environ 50 000 cellules pour un nodule volumineux) ce qui correspond à l'infiltrat NK observé dans le modèle s.c (Article 1, Figure 4D et Figure 36/37).

La fréquence de cellules NK est très importante dans le foie (10-15%) mais en terme de nombre de cellules, il compte moins de cellules NK que la rate (Grégoire et al., 2007). C'est l'organe le plus touché par la pousse tumorale. Est-ce dû à une absence de contrôle causée par un nombre trop faible de cellules NK, une localisation dans des zones non colonisées par la tumeur ou également à un processus d'épuisement ? L'analyse élémentaire du nombre de cellules NK par unité de volume (environ 100 000 cellules NK/cm<sup>3</sup> dans le foie contre plus de 10 millions/cm<sup>3</sup> pour la rate) suggère que les cellules NK sont peu au contact des cellules tumorales et peuvent avoir des difficultés à les atteindre dans cet espace volumineux comparé à celui de la rate (Article 1, Figure 4C). Pour étudier de manière plus complexe les interactions entre les cellules tumorales et les cellules NK, nous souhaitons maintenant réaliser des expériences de microscopie confocale. Ces expériences nous permettront de déterminer si les cellules NK sont réellement au contact des cellules tumorales dans ces organes.

L'ensemble de nos données suggère donc que le contrôle est finalement plus efficace dans la rate et dans la circulation et qu'il est moindre dans le foie et les autres organes où la tumeur pousse plus rapidement (Article 1, Figure 3B).

De plus, il existe une dichotomie entre réponse anti tumorale et épuisement puisque la plupart des cellules tumorales semblent éliminées dès le début mais l'épuisement survient au stade tardif.

Malgré les limites et les interrogations citées jusqu'à présent, nous avons tout de même été en mesure d'étudier le phénotype des cellules NK dysfonctionnelles au niveau de la rate.

#### 4- Activation et épuisement : le revers de la médaille ?

Le terme « épuisement » implique qu'il y a, en premier lieu, une phase d'activation et que le maintien de cette activation finit par « épuiser » les cellules.

Dans notre modèle, les cellules semblent bien activées comme le montre l'augmentation de CD69 à la surface des cellules ou encore l'augmentation de la prolifération mesurée indirectement par Ki67 ou plus directement par des expériences utilisant le CTV *in vivo* (Article 1, Figure 5A et B). L'expression membranaire basale du marqueur CD107a est également plus forte confirmant ce phénotype activé (Article 1, Figure S5). Cette activation croît parallèlement à la croissance tumorale. Dans cette phase initiale, les cellules NK dégranulent et ont une activité cytotoxique face à des cibles YAC1 plus importante que des cellules NK naïves. De surcroît, elles présentent un métabolisme activé, comme nous avons pu le montrer lors d'expériences utilisant le « Seahorse » (*ie* plus de glycolyse et d'OXPPOS) (Figure 49). Ce métabolisme accru est aussi reflété par l'augmentation de la taille et de la granulosité cellulaire (Rathmell et al., 2000) (Figure 50B) tout comme l'expression de CD98 et CD71 (Figure 50A). Les mitochondries semblent également plus actives (Figure 51) comme cela a pu être mis en évidence pour les LT CD8 épuisés dans l'infection LCMV (Bengsch et al., 2016).

Globalement, les modifications métaboliques observées dans le modèle RMA-KR rejoignent en partie ce qui a pu être démontré concernant les LT CD8<sup>+</sup> épuisés (en contexte infectieux et tumoral) (Tableau 5).

LT CD8+ épuisés (données de la littérature)	NK non fonctionnelles (données du modèle RMA KR)
Privation en glucose et diminution de la prise de glucose (sonde 2NBDG, surexpression de Glut-1) Bengsch et al, 2016 ; Scharping et al 2016, Chang et al 2015	Non réalisé
<b>Analyse en GSEA:</b> glycolyse diminuée, OXPHOS et métabolisme des acides gras augmentés Bengsch et al, 2016 <b>SeaHorse:</b> OXPHOS diminuée Bengsch et al 2016, Schurich et al 2016	<b>RNA Seq, GSEA:</b> gènes impliqués dans la voie de l'OXPHOS diminué <b>Utilisation du SeaHorse:</b> les deux voies sont augmentées par rapport aux souris CTRL mais inchangées par rapport aux RMA Pas de mesure des acides gras réalisée
<b>Utilisation du MTDR:</b> Dépolarisation des mitochondries (Bengsch et al 2016)	<b>Utilisation du TMRM:</b> différence non significative
<b>Microscopie, Mitotracker</b> Augmentation de la masse, élongation, fusion des mitochondries (Bengsch et al 2016)	<b>Utilisation du MitoTracker:</b> Augmentation de la masse Expérience de microscopie à réaliser
<b>MitoSox:</b> Augmentation des ROS (Bengsch et al 2016)	<b>Utilisation du MitoSox:</b> Augmentation des ROS
Signature transcriptionnelle spécifique (Analyse modulaire par GSEA: module d'épuisement, module de « dysfunction » ) Bengsch et al 2018, Singer et al 2016	<b>GSEA:</b> Signatures de l'épuisement/dysfonction retrouvées dans les cellules NK (avec diminution des gènes impliqués dans les voies du métabolisme)
<b>Mécanismes impliqués:</b> Baisse de l'activité de mTOR après activation mais hausse du niveau basal: Bengsch et al 2016 Augmentation de PD-1 : Patsoukis et al 2015, Scharping et al 2016 Augmentation de PGC1- $\alpha$ : Bengsch et al, Scharping et al	Augmentation du niveau basal de la voie mTOR, baisse de l'activité de mTOR après stimulation avec de l'IL-15 PD-1 non augmenté PGC1- $\alpha$ non retrouvé dans les gènes différenciellement exprimés

**Tableau 5: Comparaison des principales données concernant le métabolisme des LT CD8+ épuisées et les cellules NK du modèle RMA-KR**

Cette augmentation en termes d'activation et de métabolisme peut être en partie expliquée par une intensification de l'activité basale de mTOR qui a été mesurée par les niveaux de phosphorylation à l'état basal des cibles de cette voie (pS6, pAkt). La phosphorylation de STAT5 montre une tendance à la hausse qui n'est pas significative. Ceci peut être dû au petit nombre d'échantillons analysés ou à la plus grande difficulté de détecter les niveaux endogènes de phosphorylation de STAT5. Cette expérience sera répétée par la suite.

Cependant, ces caractéristiques ne sont pas propres à la condition RMA-KR. En effet, les cellules NK de souris RMA présentent les mêmes niveaux d'activation. Dans la condition RMA, on retrouve également une expression plus forte de CD69, de Ki67 et de CD107a au niveau basal ainsi qu'un métabolisme plus activé. L'activation et la prolifération accrue des cellules NK dans les souris porteuses de tumeur résultent probablement de l'exposition à l'IL-15 connue pour induire ces processus (Lucas et al., 2007b). Cependant, les niveaux d'IL-15 sont difficilement

mesurables puisque cette cytokine agit majoritairement par trans-présentation (Mortier et al., 2008).

Dans notre modèle, les tumeurs RMA et RMA KR conduisent à l'activation des cellules NK, mais l'on observe une perte de fonction uniquement dans le modèle RMA KR. L'activation précède donc l'épuisement mais n'est pas suffisante (du moins, pour les paramètres que nous avons analysés) pour induire de l'épuisement. Cela nécessite d'autres facteurs, probablement l'engagement soutenu du récepteur activateur NKG2D puisque c'est la seule différence existant entre les deux modèles. Les paramètres d'activation que nous avons mesurés ne sont pas spécifiques de l'activation via NKG2D mais sont des paramètres globaux, y compris de l'activation en aval de l'IL-15.

En parallèle de ces similarités, on observe certains changements phénotypiques spécifiques de la condition RMA-KR. Par exemple, certains ICP sont augmentés, essentiellement Tim-3 puis TIGIT. CD96 est également fortement exprimé par les cellules NK de souris RMA-KR mais nous n'avons pas encore testé l'expression de ce marqueur pour les cellules NK de souris RMA. Ceci confirme que les cellules sont bien activées qualitativement différemment dans la situation RMA-KR. L'augmentation de ces ICP pourrait contribuer à la boucle de rétro-contrôle négatif.

## **5- A la recherche d'explications moléculaires ...**

Globalement, les mécanismes moléculaires qui conduisent à la perte de fonction des cellules NK sont peu caractérisés. Comme nous l'avons vu dans l'introduction de ce manuscrit, les causes supposées de la perte de fonction sont liées à la stimulation chronique par les cibles ou par les cytokines pro-inflammatoires, ou à d'autres causes dues au TME (cellules immunosuppressives, cytokines anti-inflammatoires, absence de nutriments, hypoxie) (Bi and Tian, 2017).

- Altérations moléculaires dans les voies de signalisation

Les cellules NK de souris RMA-KR montrent une diminution dans l'expression des différents NKaR testés (NK1.1, NKp46 et NKG2D) pouvant expliquer la perte de réponse globale aux différents stimuli (Figure 43). En revanche, l'augmentation de

l'expression de DNAM-1 sur les cellules positives pourrait suggérer un mécanisme compensatoire qui se met en place lorsque les cellules diminuent certains NKaR.

Dans le modèle RMA-S injecté en s.c, les cellules NK perdent leur capacité à répondre *ex vivo* à différents types de stimuli (anti NK1.1, anti NKp46, YAC) suggérant des défauts de transduction des signaux activateurs, au niveau proximal, qui affectent précocement les voies de signalisation (Ardolino et al., 2014). Au contraire, les cellules NK infiltrant les tumeurs RMA-S répondent, de manière similaire aux cellules NK des tumeurs RMA, à une stimulation PMA/ionomycine. Ce type de stimulation s'affranchit des événements précoces de signalisation en induisant le flux calcique et en mimant la présence de diacylglycérol, activant ainsi certains facteurs de transcription (NFAT, NFκB) (Chatila et al., 1989). L'exposition des cellules NK *in vivo* aux RMA-S conduit à des défauts d'activation de Erk1/2 (appartenant à la voie des MAP Kinases) or la kinase Erk est connue pour promouvoir la cytotoxicité et la production de cytokines dans les cellules NK (Jiang et al., 2000; Vivier et al., 2004; Wei et al., 1998). Ardolino *et al.* ont également pu noter une diminution de l'activation d'Akt dans une moindre mesure. Une autre étude rapporte également l'implication des voies Erk et PI3K/Akt dans la perte de fonction des cellules NK infiltrant des tumeurs déficientes pour le CMH-I (TC-1 et MC38) (Seo et al., 2017b).

- Perte des adaptateurs de signalisation

Chez l'homme, l'hypo-réponse des cellules NK adaptatives suite à des stimulations cytokiniques est associée à la perte de protéines adaptatrices tels que FcRγ, Eat2 et Syk (Schlums et al., 2015).

L'utilisation de RMA modifiées pour exprimer un ligand de NKG2D, H60, comparé aux RMA, a montré que l'engagement chronique de NKG2D *in vitro* conduit à une perte de fonction (Coudert et al., 2008). Les cellules NK continuellement exposées aux RMA H60<sup>+</sup> présentent un déficit en protéines adaptatrices DAP10/12. Ceci explique leur faible réponse à des stimulations impliquant les récepteurs qui signalent via ces protéines adaptatrices. Les cellules NK exposées de manière prolongée aux cibles H60<sup>+</sup>, présentent un flux calcique diminué en réponse à divers stimuli engageant DAP10/12 mais aussi FcRγ, une autre protéine adaptatrice



employée notamment par NK1.1. Nous n'avons pas observé de diminution du flux calcique dans les cellules NK provenant de souris RMA-KR après stimulation par un anti NK1.1 (Figure 47A). Une des explications à ces différences inter-études est que nous avons analysé l'exposition chronique à des cibles *in vivo* alors que les données concernant les cibles H60<sup>+</sup> ont été obtenues *in vitro*. Il est intéressant de noter que dans l'étude citée, l'exposition chronique *in vitro* à des cellules de type RMA-S n'entraîne pas de défauts fonctionnels.

Nous souhaitons maintenant mesurer l'expression des différentes protéines adaptatrices de signalisation (Zap70, FcR $\gamma$ , Eat2, Syk, CD3 $\zeta$ , DAP 10 et DAP 12) afin d'écarter ces causes possibles.

- perte de l'organisation des différents acteurs

L'organisation sous membranaire et notamment la mise en place du réseau d'actine sont importantes pour agencer les récepteurs à la membrane et permettre la transduction du signal comme cela a été montré dans les cellules NK éduquées vs non éduquées (Guia et al., 2011). Dans une autre étude, les auteurs montrent que les contacts synaptiques entre les cellules NK et des cibles AML sont défectueux après des interactions prolongées et ne conduisent pas à la lyse des cellules cibles (Khaznadar et al., 2014). Ces défauts résulteraient d'une mauvaise polarisation des granules causée par l'absence de recrutement de CD3 $\zeta$  malgré le recrutement correct des filaments d'actine et de l'intégrine LFA-1.

Dans notre modèle, la polarisation de l'actine et la formation de conjugués avec des cibles YAC-1 se font de manière similaire pour les cellules NK issues de souris RMA et de souris RMA KR (Figure 48).

- perte de réponse à l'IL-15

Dans notre modèle, il semblerait que deux types d'épuisement soient impliqués 1- dû à l'engagement chronique de NKG2D et 2- dû à la stimulation chronique par l'IL-15. Par ailleurs, des interconnexions entre les voies de signalisation en aval de NKG2D et du récepteur à l'IL-15 ont été rapportées (Horng et al., 2007). Etant donné que nous observons un défaut de réponse de nos cellules à l'IL-15 (Figure 6C), il serait intéressant de mesurer dans notre modèle l'expression de CD122/CD132 (IL-15R) et de déterminer s'il existe des altérations à ce niveau également. Nos données



préliminaires ne suggèrent pas de changement dans leur expression de CD122/CD132 mais les souris testées présentaient peu de tumeur aux stades terminaux. Cependant le fait que les niveaux d'activation de STAT5 ne soient pas modifiés après stimulation avec de l'IL-15 *in vivo* suggère qu'il n'existe pas de modifications dans l'expression du récepteur à l'IL-15 dans les cellules NK de souris RMA KR comparées à celles de souris RMA ou contrôles (Article 1, Figure 6E). Dans les cellules NK dysfonctionnelles, l'IL-15 n'induit pas d'augmentation du flux calcique (Figure 47A) et l'activation de la voie mTOR est altérée en réponse à cette cytokine (Article 1, Figure 6E) ce qui peut conduire à des défauts métaboliques. Il a été montré qu'une stimulation chronique avec de l'IL-15 peut altérer la signalisation (notamment au niveau de l'activation de mTOR) et conduire à une baisse de la production d'IFN- $\gamma$  (Felices et al., 2018). La dégranulation n'est cependant pas affectée après cette stimulation chronique, ce qui rejoint nos observations.

- Expression d'ICP

Nous avons vu que les cellules NK de souris RMA KR expriment l'ICP Tim-3. Les cellules Tim-3<sup>+</sup> sont d'ailleurs les plus fonctionnellement actives après re-stimulation *ex vivo* (Figure 45). Ceci corrobore bien les données de la bibliographie montrant que les ICP sont plutôt une conséquence du surplus d'activation et de l'épuisement mais ne sont pas une cause en soi (Avery et al., 2018; Odorizzi et al., 2015). Ils seraient à l'inverse protecteurs d'une activité résiduelle qui peut être démasquée en retirant le ligand. Par exemple, des souris déficientes pour PD-1 présentent un épuisement des lymphocytes T plus exacerbé que les souris non déficientes (Odorizzi et al., 2015) et les cellules PD-1<sup>+</sup> sont en réalité les plus actives (Hsu et al., 2018). Ceci explique aussi que les thérapies anti-ICP fonctionnent (Seidel et al., 2018), puisqu'une fois le frein supprimé, les cellules exprimant les ICP sont plus répondeuses que les autres.

Dans ce contexte, il serait intéressant dans un second temps d'analyser la pousse tumorale des RMA-KR et l'épuisement des cellules NK en présence de ces cellules dans des modèles de souris déficientes pour Tim-3 ou TIGIT (Avery et al., 2018; Joller et al., 2011). Dans le même ordre d'idée, nous pourrions analyser la fraction de cellules NK exprimant les récepteurs inhibiteurs Ly49C/NKG2A reconnaissant le CMH-I qui pourraient être protégées de l'épuisement.

Nous n'avons observé qu'une très faible augmentation de PD-1 contrairement à d'autres systèmes où les ICP sont étudiés dans des tumeurs solides (Hsu et al., 2018). Globalement, les ICP ne sont que peu exprimés par les cellules et quasi jamais co-exprimés dans ce modèle. A noter qu'il est difficile d'être certains des résultats puisque les marquages diffèrent selon l'anticorps et le fluorochrome utilisés. Comme nous l'avons dit précédemment, sans la présence du ligand, un ICP est inerte. C'est pourquoi nous avons souhaité mesurer l'expression des ligands des ICP sur les cellules tumorales *in vivo* à différents temps. Cependant, les ligands de Tim-3 ne sont pas bien caractérisés et il n'existe pas forcément d'anticorps les reconnaissant. Le plus connu est la galectine 9 mais cette protéine peut aussi être présente sous une forme sécrétée, soluble (Gonçalves Silva et al., 2017). Il est donc compliqué de mesurer l'influence du ligand dans ce contexte. CD155, le ligand partagé de DNAM-1, TIGIT et CD96 (Bottino et al., 2003a; Chan et al., 2014; Stanietsky et al., 2013) est exprimé de base par les cellules RMA et RMA KR en culture et n'est pas augmenté à la surface des cellules tumorales *in vivo* ; il serait à l'inverse faiblement diminué bien que ces mesures méritent d'être répétées.

Enfin, nous avons cherché à diminuer la transduction d'un éventuel signal inhibiteur via Tim-3 dans les cellules NK de souris RMA KR par utilisation d'un anticorps bloquant (Figure 56) comme cela a déjà été réalisé dans le traitement de cancer (Kim et al., 2017; Liu et al., 2017; da Silva et al., 2014). Les premiers résultats obtenus ne sont pas en faveur d'un impact positif et n'améliore aucunement la survie des souris. Néanmoins, comme nous l'avons dit précédemment, il faut distinguer survie et épuisement dans la rate. Il conviendrait donc de répéter l'expérience en analysant cette fois la fonctionnalité des cellules NK au cours du temps.

#### - Le répertoire est-il modifié ?

L'infection à CMV conduit à l'expansion d'un sous-type particulier de cellules NK exprimant NKG2C qui sont stimulées par des peptides CMV exprimés sur les molécules HLA-E chez l'homme (Gumá et al., 2006) et de cellules NK Ly49H<sup>+</sup> reconnaissant le peptide viral m157 (Dokun et al., 2001). Ces cellules NK spécifiques de CMV, dites adaptatives, sont peu répondeuses lorsqu'elles sont re-stimulées *ex vivo* par des cytokines (Schlums et al., 2015; Sun et al., 2011). Nous avons voulu déterminer si dans notre système, l'apparition d'une population de cellules hypo-

répondeuse était associée à des biais de répertoire. Nos analyses n'ont pas permis de mettre en évidence un tel biais. Aucune prolifération d'un sous-type particulier qui serait induit par la tumeur et donc spécifique n'a pu être mis en évidence (Article 1, Figure S5B). Par contre, on observe une prolifération globale des CD11b<sup>-</sup> (immatures) (Article 1, Figure 5E/F), ce qui explique que l'on observe un défaut de maturation aux stades terminaux. Ce biais ne permet pas d'expliquer la perte de fonction observée puisque tous les sous types (CD11b<sup>-</sup>, CD11b<sup>+</sup>/CD27<sup>+</sup> et CD27<sup>+</sup>) sont hypo-fonctionnels (Figure 32). Nous ne savons pas non plus si l'augmentation de la fréquence des cellules immatures est due uniquement à la prolifération des CD11b<sup>-</sup> ou si elle est causée par la mort des cellules NK matures, une question que nous pourrions adresser avec le modèle mathématique.

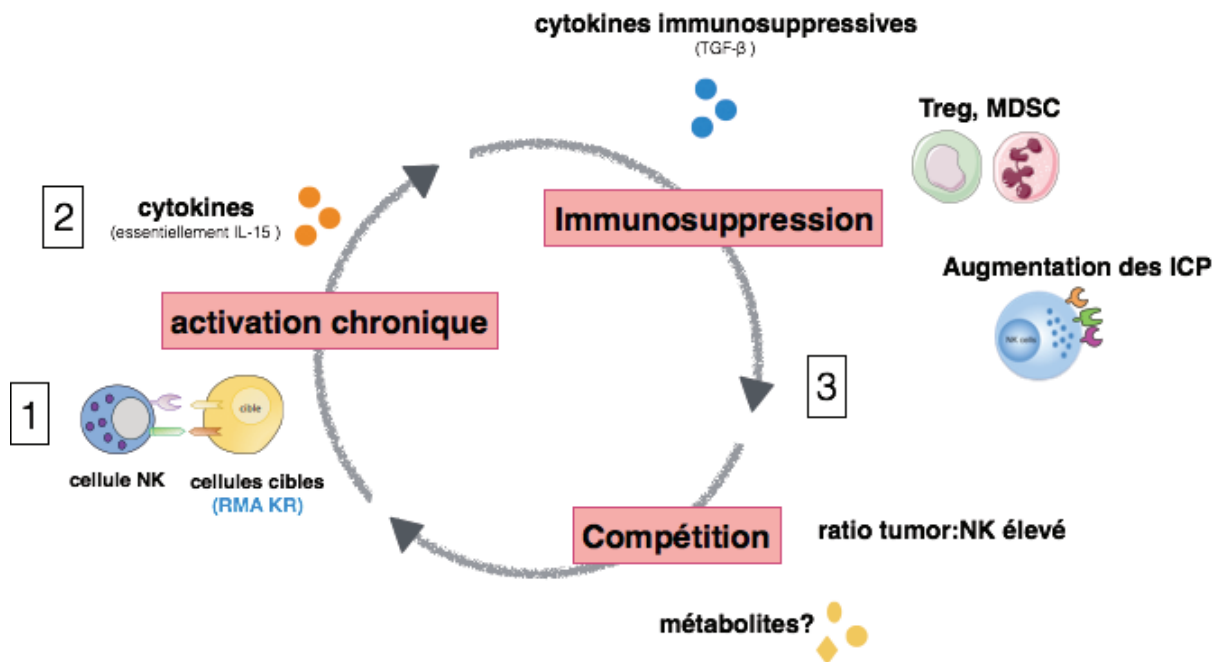
- Existe t-il d'autres causes extrinsèques impliquées ?

Afin de déterminer si des causes extrinsèques, liées au TME pourraient expliquer la perte de fonction des cellules NK, nous avons analysé s'il existe des différences de recrutement de cellules immunosuppressives capables d'inhiber les fonctions des cellules NK (Ghiringhelli et al., 2005; Srivastava et al., 2012). On observe en effet un recrutement de LT régulateurs, de cellules neutrophiles ou MDSC (les deux étant difficilement distinguables par immunomarquage) dans la rate des souris porteuses de tumeurs. Cependant, ces cellules sont présentes en quantité équivalente après injections des cellules tumorales RMA ou RMA KR aux différents stades analysés. Sans être les inducteurs du phénomène d'épuisement, spécifiquement dans les souris RMA-KR, ces cellules immunosuppressives, tout comme la compétition qui existe entre les cellules tumorales et les cellules immunitaires peuvent participer à l'épuisement des cellules NK.

Enfin, le taux de TGF- $\beta$ , cytokine anti-inflammatoire connue pour inhiber l'activation de mTOR (Viel et al., 2016), semble légèrement plus élevé dans la rate de souris RMA KR comparées à des souris contrôles ou RMA (Figure 54). Ceci pourrait sembler en contradiction avec le niveau basal élevé de pS6 dans les cellules NK de souris RMA KR, cependant les niveaux mesurés restent très faibles.

Pour résumer, si l'on fait le parallèle avec le modèle à 3 signaux, proposé pour expliquer le processus d'épuisement des lymphocytes T CD8 (McLane et al., 2019),

nous pourrions proposer pour l'instant un modèle nécessitant 1- un signal d'activation chronique par la cible qui est le seul apparaissant comme responsable de la perte de fonction au cours du temps 2- un signal cytokinique dont le médiateur est probablement l'IL-15 dans notre modèle et 3- des signaux inhibiteurs provenant du TME qui vont amplifier l'atteinte fonctionnelle des cellules NK (Figure 66).



**Figure 66: Modèle à 3 signaux de la perte de fonctionnalité des cellules NK**

*cf. le paragraphe 4- à la recherche d'explications moléculaires*

- Existe t-il un programme transcriptionnel propre à l'épuisement ?

Les cellules NK « épuisées » présentent une signature transcriptionnelle similaire à celles qui ont été rapportées dans la littérature pour les LT épuisés (Bensch et al., 2018; Singer et al., 2016). Dans les cellules NK issues de souris RMA-KR, nous avons ainsi observé par analyse GSEA une sur-représentation des gènes associés à l'épuisement, alors que les cellules NK de souris RMA sont enrichies pour les gènes associés à l'activation (Figure 53). De plus, les analyses GSEA montrent que la phosphorylation oxydative est la première voie diminuée dans les cellules NK de souris RMA-KR suggérant un métabolisme plus faible de ces cellules comparées aux cellules NK de souris RMA. Ces données renforcent donc l'idée d'analyser le

métabolisme des cellules NK de RMA KR, notamment à des points plus tardifs (*ie* lorsque la charge tumorale est plus importante) par utilisation du « Seahorse ». D'autres voies sont également diminuées dans les RMA KR comme les voies de la traduction et du protéasome par exemple parmi celles que nous souhaiterions analyser de manière plus détaillée puisqu'elles sont liées à mTOR (Fonseca et al., 2014; Zhao et al., 2015).

Par ailleurs, nous pourrions imaginer répéter ces analyses de RNA Seq en utilisant en parallèle des cellules NK stimulées *in vitro* par des cibles ou des cytokines à des temps courts. De même, il serait intéressant de comparer les signatures transcriptionnelles des cellules Tim3<sup>+</sup> et Tim3<sup>-</sup> dans ce modèle.

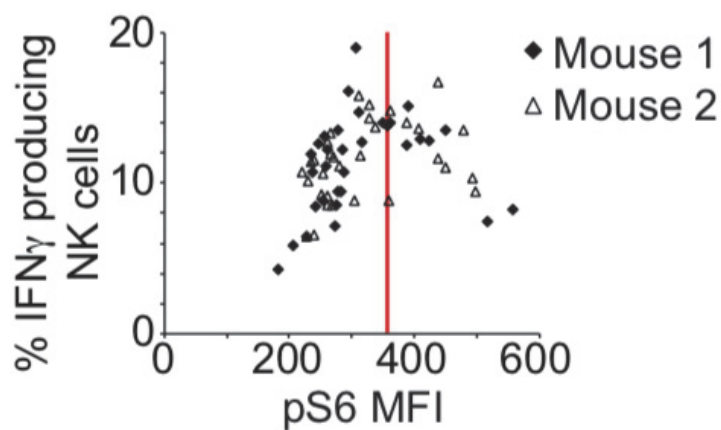
Ces données sont à notre connaissance la première signature transcriptionnelle établie pour des cellules NK dysfonctionnelles en contexte tumoral. Elles suggèrent pour la première fois un probable lien mécanistique entre le processus d'épuisement des LT CD8 et la perte de fonctionnalité des cellules NK. Ces résultats permettent d'orienter nos recherches vers de nouvelles pistes pouvant potentiellement expliquer les dérégulations fonctionnelles avec notamment les voies de la traduction, du protéasome et du métabolisme. Ceci renforçant un possible lien avec la voie mTOR. L'identification des changements épigénétiques sera réalisée par la suite car nous avons pu mettre en évidence, par exemple, des modifications dans l'expression de facteurs de transcription comme Tox connu pour être induit lors de l'épuisement des TCD8 (Alfei et al., 2019; Khan et al., 2019; Scott et al., 2019; Yao et al., 2019).

Afin de caractériser encore plus précisément les cellules NK dysfonctionnelles et de lier cette signature transcriptionnelle aux changements protéiques, nous souhaitons réaliser des analyses de protéomique. La quantité de matériel est un facteur limitant de ces études à grande échelle. Le modèle RMA KR présente comme avantage de permettre l'isolation de grandes quantités de cellules au phénotype épuisé. C'est, en ce sens, un formidable atout.

## **5- mTOR ou le pouvoir de contrôler la réactivité des cellules NK**

En faisant le parallèle avec le processus d'éducation, les mécanismes impliqués ici pourraient être similaires à ceux conduisant à la perte de fonction des cellules NK

non exposées au CMH-I dans le modèle B2m<sup>-/-</sup> ou des cellules NK sauvages transférées dans des hôtes déficients pour le CMH-I (Fernandez et al., 2005; Joncker et al., 2010). Comme nous l'avons montré dans une étude précédente, mTOR est essentielle pour la réactivité des cellules NK en amplifiant le signal en aval des NKaR (Marçais et al., 2017). De façon paradoxale, certaines données non publiées de notre laboratoire suggèrent que la fonctionnalité des cellules NK est dépendante d'un niveau optimal d'activité de mTOR et que si ce niveau est trop élevé alors la capacité de production d'IFN- $\gamma$  en réponse à la stimulation chute (Figure 67). Nous proposons qu'une des causes de l'épuisement que nous observons soit une activation trop forte et prolongée de la voie mTOR.



**Figure 67: Fonctionnalité des cellules NK en fonction du niveau d'activité de mTOR**

Corrélation entre le niveau de pS6 basal (pS6 MFI) et la production d'IFN- $\gamma$  après restimulation avec un anti NK1.1 par les cellules NK de deux souris.

En effet, au niveau moléculaire, nos résultats montrent une plus forte activité basale de la voie mTOR dans les cellules NK exposées aux RMA-KR *in vivo* (Figure 46). La voie PI3K/Akt/mTOR semble donc impliquée et les défauts dans l'activité de mTOR pourraient être en partie expliqués par des altérations en amont, au niveau de la PI3K. Les isoformes PI3K $\delta$  et PI3K $\gamma$  assurent la maturation des cellules NK et la perte de ces sous-unités entraîne une diminution du nombre et une baisse de la maturité des cellules NK en périphérie (Tassi et al., 2007). De plus, la PI3K $\delta$  est essentielle à la cytotoxicité et la production de cytokines (Guo et al., 2008; Kim et al., 2007).

Pour continuer d'élucider le rôle de la voie PI3K/Akt/mTOR dans la perte de fonctionnalité des cellules NK, nous souhaitons maintenant utiliser différents outils. Tout d'abord, nous avons entrepris de mesurer l'activité de la PI3K afin d'identifier le point à partir duquel le signal est différent entre cellules NK épuisées et cellules NK non stimulées. Cette expérience est effectuée en collaboration avec l'équipe du Dr Bernard Payraastre à Toulouse qui quantifiera la quantité de phosphatidyl-inositol 3,4,5 tri-phosphate (abrégé PtdIns(3,4,5)P ou PIP3) produit de la réaction catalysée par la PI3K. Cette quantification sera effectuée sur des extraits cellulaires de cellules NK de souris RMA ou RMA KR aux stades terminaux. L'analyse des données est en cours. De plus, nous avons généré par technique de CRISPR/Cas9 des souris PI3K $\delta$  déficientes ou au contraire présentant une mutation constitutivement active. Ces souches de souris nous permettront d'analyser le rôle de PI3K $\delta$  dans le contrôle de la croissance tumorale, dans notre système.

Pour mieux caractériser l'impact d'une sur-activation de la voie mTOR, nous disposons de souris déficientes pour TSC-1 qui est un régulateur négatif de mTOR. Dans ces souris mTOR est constitutivement activée. Nous analyserons la survie de ces souris après injections de RMA KR par comparaison avec celle de souris sauvages ou de souris partiellement déficientes pour mTORC1 (Raptor<sup>+/-</sup>) injectées avec la même lignée. La fonctionnalité des cellules NK sera également analysée à différents stades afin de déterminer si le processus d'épuisement est plus ou moins rapide dans ces deux souches. En effet, nous pensons qu'une activation trop prolongée de mTOR est délétère pour les cellules NK.

Afin de contrôler cette activation inadaptée de la voie mTOR, nous avons utilisé un inhibiteur pharmacologique spécifique de mTORC1, la rapamycine. Cet inhibiteur a été utilisé dans le modèle LCMV d'infection aiguë où les auteurs observent un effet positif sur la quantité et la qualité des LT mémoires (Araki et al., 2009). D'autre part, de façon contre-intuitive, l'inhibition de mTOR avec un autre type d'inhibiteur (vistusertib) a également fait ses preuves quant à l'amélioration de la réponse TCD8 contre les tumeurs MC-38 (Langdon et al., 2018).

Dans notre système, le traitement des souris à la rapamycine montre un effet bénéfique sur l'expression de Tim-3 mais aucune amélioration de la survie des souris, ni de la pousse tumorale (Figure 57). Il faut noter que nous avons commencé



à traiter les animaux à jour 4 en nous basant sur les traitements avec le vistusertib (Langdon et al., 2018). Dans notre modèle, ce temps n'est peut-être pas adapté.

Cependant, la rapamycine présente de tels effets immunosuppresseurs (Powell et al., 2012) que son impact positif sur mTOR pourrait être annulé par un effet négatif trop important sur la fonctionnalité comme cela a été évoqué pour les LTCD8 (Bensch et al., 2016). C'est tout le paradoxe de ce type de traitement puisque nous avons vu qu'il faut activer les cellules pour qu'elles éliminent la tumeur tout en évitant de les épuiser. Nous souhaitons donc jouer sur l'activation en inhibant mTOR mais de manière partielle pour ne pas rendre les cellules complètement inertes.

De plus, dans ces expériences nous avons utilisé des lignées RMA KR résistantes à la rapamycine, justement dans le but de nous affranchir d'un effet parasite sur les tumeurs. A posteriori, l'absence d'effet sur la survie pourrait également être expliquée par l'absence d'impact sur la prolifération tumorale. De ce fait, en combinant l'effet potentiellement positif d'un traitement à la rapamycine sur les cellules NK et sur les cellules tumorales (*ie* en utilisant les lignées classiques RMA KR sensibles à la rapamycine), nous pouvons espérer un effet bénéfique. Enfin, comme nous l'avons vu, la survie ne rend pas compte de l'état d'épuisement des cellules NK. Ainsi pour déterminer s'il existe un effet bénéfique sur l'épuisement il sera nécessaire de tester la fonctionnalité des cellules NK dans ces expériences.

Afin de montrer que l'activité de mTOR est nécessaire aux temps précoces, nous débuterons le traitement à J-1 ainsi qu'à différents temps post injection. La fonctionnalité des cellules NK sera ici aussi analysée en parallèle des expériences de survie.

Pour conclure ces différents chapitres, nous disposons donc de données robustes concernant la perte de fonctionnalité des cellules NK dans le modèle RMA KR. Certaines de nos données sont claires mais d'autres nécessitent d'être répétées. La difficulté réside dans le court laps de temps dont nous disposons pour étudier le stade terminal. La voie mTOR semble être impliquée mais nous souhaitons le démontrer formellement en utilisant des approches génétiques et pharmacologiques. Enfin, les cellules NK dysfonctionnelles présentent des caractéristiques communes avec les LTCD8 épuisés comme le montrent les signatures spécifiques retrouvées pour les cellules NK.



## 6- Perspectives

Comme nous l'avons vu en introduction, les immunothérapies utilisant les cellules NK sont prometteuses et ouvrent de nouvelles perspectives (Chiossone et al., 2018; Hodgins et al., 2019; Souza-Fonseca-Guimaraes et al., 2019). En effet, les cellules NK pourraient être de bonnes cibles thérapeutiques pour les tumeurs échappant à la réponse T CD8 via la perte de CMH-I. Cependant les thérapies utilisant le transfert de cellule NK par exemple, échouent (Gill et al., 2012) car les cellules NK deviennent anergiques. Mieux comprendre les phénomènes en jeu dans la perte de fonction apparaît donc essentiel pour choisir de nouvelles cibles.

Le modèle que nous avons développé est prometteur pour tester différentes possibilités thérapeutiques visant à revigorer les cellules NK.

Tout d'abord, les cellules RMA KR ont été utilisées selon deux types d'injection et l'ensemble des données semble souligner l'existence de différences entre le modèle de tumeur solide (injection en s.c) et de tumeur de type « liquide » (injection en i.v). Dans le tissu tumoral (au sein d'une tumeur solide), les cellules NK sont généralement localisées au niveau des vaisseaux. Elles se retrouvent en périphérie via le système S1P et sont recrutées au niveau de la tumeur via la circulation sanguine et grâce à l'action de chimiokines reconnues par les récepteurs CXCR3 et CX3CR1 (Grégoire et al., 2007). Nous pensons que l'absence de contrôle des tumeurs solides résulte en premier lieu du faible infiltrat immunitaire (et donc du manque de cellules NK) puis potentiellement d'un épuisement plus rapide.

Afin de tester si des thérapies recrutant des cellules NK pouvaient être efficaces, nous avons souhaité modifier les RMA KR pour les faire exprimer des chimiokines attirant les cellules NK. Pour cela, nous avons utilisé un lentivirus dans lequel nous avons inséré les gènes codant pour CCL3, CCL10 et VEGF. Cette lignée RMA-KR nommée CCV<sup>+</sup> a été clonée et sera utilisée pour un futur projet de recherche afin de déterminer si elle est plus efficacement éliminée que la lignée parentale RMA-KR. De même, l'efficacité d'élimination de ces cellules pourra être testée dans le système d'injection en i.v et permettra d'analyser si un nombre plus important de cellules NK dans des organes autres que la rate permet d'améliorer le contrôle et de limiter/retarder la pousse. Nous pouvons d'ailleurs nous demander quel serait

l'impact de bloquer la migration des cellules NK en inhibant le récepteur S1P5 ou en utilisant des souris déficientes pour ce récepteur par exemple (Walzer et al., 2007b). Ces lignées permettront peut-être également de ralentir la croissance des métastases et donc la mort des animaux ce qui facilitera l'étude de l'épuisement dans la rate.

Enfin, le modèle peut être utilisé pour répondre à d'autres questions, comme la notion de mémoire NK. Est-ce que les cellules NK de souris ayant rejeté des cellules RMA KR injectées en faible quantité pourraient mieux répondre à une deuxième rencontre avec la tumeur ou à l'inverse, présenteraient un phénotype d'épuisement exacerbé ?

Des procédés de vaccination pourraient également être testés dans ce modèle, comme cela a été fait précédemment dans un système utilisant des tumeurs déficientes pour le CMH-I et où les auteurs restaurent l'activité des cellules NK via un vaccin (B/Mo/tAg/aGC) basé sur des monocytes/lymphocytes B exprimant le ligand des cellules NKT alpha galactosylceramide (aGC) chargé sur un antigène tumoral (tAg) (Seo et al., 2017b). Leur étude montre que ce vaccin permet la production d'IL-21 par les cellules NKT qui active ensuite les voies PI3K/Akt dans les cellules NK et améliore la fonctionnalité.

Nous pouvons imaginer des thérapies basées sur l'utilisation de CAR NK reconnaissant une molécule exprimée par les RMA et tester leur effet sur la survie des souris dans les différents systèmes (injections i.v, injections s.c des quatre lignées). Ces CAR NK peuvent être modifiées, par exemple, pour permettre leur recrutement au sein de la tumeur et l'augmentation de leur survie (Hodgins et al., 2019) puisque nous avons vu qu'un problème majeur est le faible infiltrat NK dans ces tumeurs solides ou dans les métastases.

Tester d'autres traitements utilisant des cellules NK ayant été pré-activées de manière transitoire peut également être envisagé et nous sommes en train d'analyser le bénéfice d'une thérapie basée sur l'injection de cellules NK à différents temps dans le modèle i.v.

D'autre part, de nombreuses thérapies sont basées sur l'utilisation de cytokines comme l'IL-15, ce qui n'apparaît pas forcément comme prometteur au vu de ce que nous avons développé en introduction de ce manuscrit (Felices et al., 2018). De plus,

nos données confortent cette idée dans le sens où les thérapies utilisant du poly (I:C) induisant la production de cette cytokine ont échoué à améliorer la survie des animaux RMA KR (Figure 56).

Les RMA et leur homologue modifié, les RMA KR, sont facilement transductibles et modifiables par technologie CRISPR/Cas9 par exemple. Nous pourrions introduire un gène « suicide » et ainsi tester l'effet sur les cellules NK de retirer le signal de stimulation chronique à différents temps.

De manière plus générale, cette lignée pourra également être utilisée dans des cribles à l'échelle de la cellule. Dans l'équipe, nous mettons au point un crible visant à déterminer par CRISPR/Cas9 l'ensemble des gènes essentiels à la lyse de ces cellules. En éteignant un à un les différents gènes dans les cellules RMA KR, nous serons en mesure de déterminer ce qui les rend sensibles ou non à la lyse NK. Le crible inverse est également possible. Les gènes peuvent être ciblés dans les cellules NK et l'analyse par séquençage des cellules NK qui parviennent à dégranuler face aux cibles RMA KR comparés à celle des cellules NK qui ont perdu cette capacité permettra d'établir quels sont les gènes essentiels à la lyse des RMA KR. Ces criblages seront établis *in vitro* et on peut imaginer les réaliser *in vivo* bien que cela nécessitera une mise au point conséquente.

Avec l'essor grandissant de la technologie CRISPR/Cas9, il est maintenant facile d'obtenir de nouvelles souches de souris déficientes pour une multitude de composants des voies importantes pour les cellules NK. Le modèle RMA KR est très accessible et pourra permettre de tester l'impact de telle ou telle mutation sur l'effet anti-tumoral des cellules NK et permettra probablement de découvrir d'autres voies impliquées, que ce soit des voies participant à l'effet pro ou anti tumoral des cellules NK et donc de proposer de nouvelles perspectives thérapeutiques. Il faudra cependant utiliser des systèmes de transfert de cellules NK modifiées afin de reintroduire la modification aux cellules NK.

D'un autre point de vue, nous pouvons également imaginer remplacer Rae1- $\beta$  par d'autres ligands de NKaR afin de tester l'impact de l'engagement chronique de tel ou tel récepteur additionné à la stimulation chronique due à l'absence de CMH-I.

## 7- L'épuisement est-il un fléau commun à toutes les pathologies ?

Nos données établies chez la souris peuvent-elles être transposées chez l'homme et dans d'autres types de pathologies ?

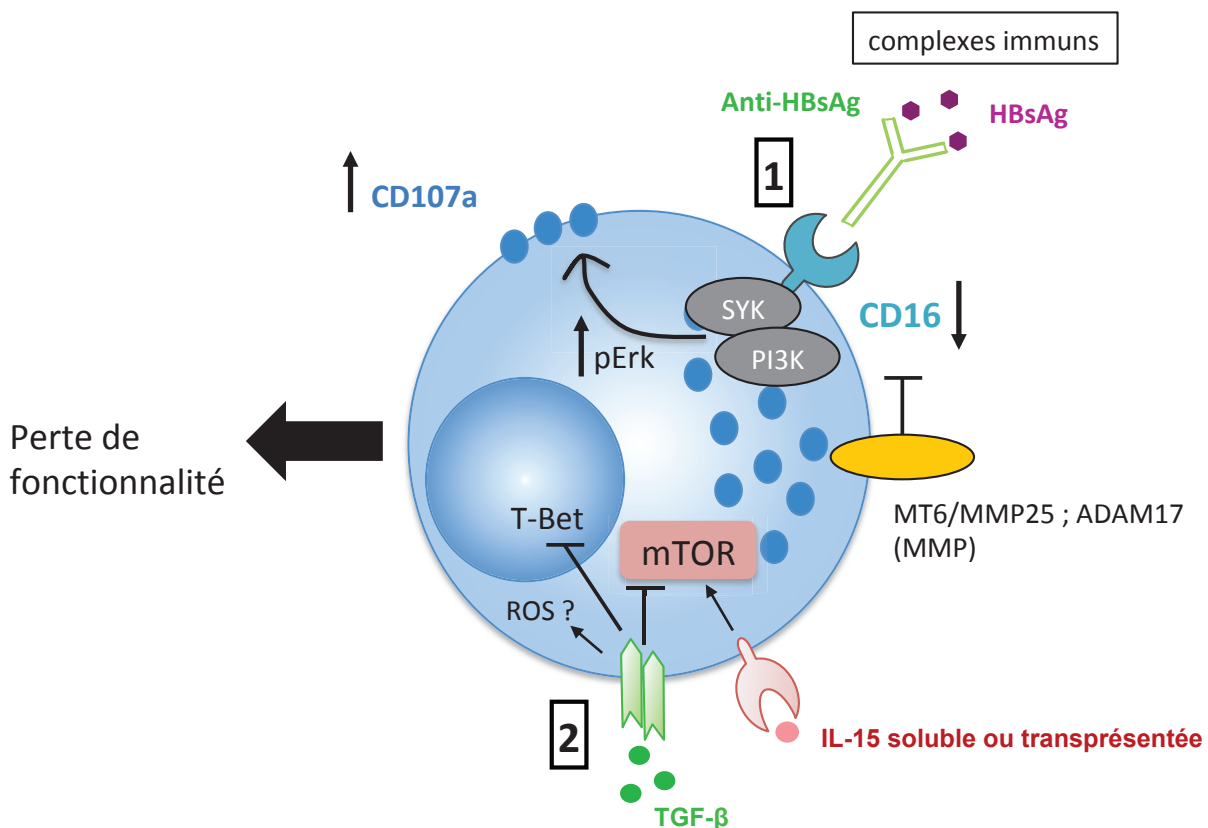
Afin d'apporter des éléments de réponse à cette question, nous avons tout d'abord étudié les voies moléculaires impliquées dans la perte de fonctionnalité des cellules NK au cours de l'infection par le virus de l'Hépatite B. Dans l'équipe, nous avons accès aux échantillons d'une cohorte de patients chroniquement infectés. Comme nous l'avons présenté dans l'article 2, nos résultats montrent que les cellules NK de patients CHB arborent une perte de fonction associée à une augmentation de l'expression de NKG2D et une diminution d'expression de CD16 et NKp30. Dans cette étude, nous avons proposé deux mécanismes pour expliquer la perte de fonction des cellules NK de patients ainsi que leur phénotype (Figure 68). Le premier est lié à la circulation de taux importants de l'antigène HBs pouvant être complexé à des anticorps et stimulant ainsi chroniquement le FcR CD16. Ceci entraînerait l'augmentation de l'activation de Erk dans les cellules et conduirait à une dégranulation spontanée accrue et à l'activation d'une boucle de rétrocontrôle régulant négativement l'expression de CD16 à la membrane. L'autre mécanisme impliqué est associé aux niveaux sériques élevés de TGF- $\beta$  qui pourrait inhiber l'activation de la voie mTOR même si la corrélation patient par patient n'est pas statistiquement significative. Le TGF- $\beta$  causerait également une diminution de T-bet et inhiberait ainsi la production d'IFN- $\gamma$ .

De plus amples études sont nécessaires pour mieux comprendre les processus en jeu chez ces patients. Cependant, c'est à notre connaissance la première étude mettant en évidence une dérégulation de la voie mTOR associée à une perte de fonction des cellules NK chez des patients chroniquement infectés par le VHB.

Nous sommes en train de préciser les caractéristiques métaboliques des cellules NK de ces patients (glycolyse/OXPHOS, état des mitochondries) et nous allons également établir la signature transcriptionnelle des cellules NK de 5 patients comparés à 5 donneurs sains par RNA Seq. Les résultats nous permettront probablement d'établir un lien entre la baisse d'activité de mTOR, le métabolisme des cellules NK chez ses patients et la perte de réponse.

En résumé, nos données mettent en évidence des défauts communs au modèle tumoral RMA KR et à la situation d'infection chronique par le VHB. On peut citer par exemple 1) la dégranulation augmentée à l'état basal mais l'induction correcte de CD107a après re-stimulation 2) la diminution drastique de la production d'IFN- $\gamma$  associée à des altérations dans l'activation de la voie mTOR après stimulation avec de l'IL-15 ce qui suggère une perte de réponse à cette cytokine 3) la présence de niveaux plus importants de TGF- $\beta$  dans l'environnement des cellules NK (à confirmer dans le modèle tumoral).

Le but est maintenant d'analyser les voies moléculaires en jeu et les signatures transcriptionnelles des cellules NK dans d'autres pathologies. Ainsi, nous espérons avoir accès à des biopsies de patientes atteintes de cancer du sein ainsi qu'à des échantillons sanguins de patients souffrant de leucémies métastatiques au diagnostic.



**Figure 68:** Modèle à 2 mécanismes de la perte de fonction NK chez les patients CHB

*Cf. paragraphe 7- L'épuisement est-il un fléau commun à toutes les pathologies.*

## 4- Conclusion et commentaires finaux

L'objectif de mes travaux de thèse était notamment de répondre à certaines questions : Quelles sont les voies moléculaires conduisant à la perte de fonction des cellules NK ? La voie mTOR est elle impliquée ? Existe-il un niveau optimal de mTOR pour permettre une réponse correcte ? Peut-on identifier un facteur clé conduisant à l'épuisement qui serait nécessaire et suffisant ?

Nous ne sommes pas parvenus à fournir une réponse claire à l'ensemble de ces questions mais nous y apportons des éléments de réponse. D'après les données de la littérature et l'incorporation de nos résultats, la voie PI3K/Akt/mTOR semble être un régulateur essentiel et une cible thérapeutique prometteuse.

Cependant certaines questions, d'ordre sémantique, subsistent : Peut-on réellement transposer le terme « épuisement » utilisé pour décrire l'état des lymphocytes TCD8 aux cellules NK ? Comment différencier activation, épuisement et suppression ? L'épuisement suggère une activation préalable, il est donc difficile de faire la distinction entre ces deux états, les deux étant enchevêtrés. Il en est de même entre « épuisement » et « suppression ». Le modèle RMA apporte ici un élément de réponse. Puisqu'il n'induit pas d'épuisement à proprement dit, l'implication du TME et de l'environnement cytokinique ne semble pas suffisant et il est possible que ces facteurs participent à l'épuisement mais n'en sont pas les inducteurs. La difficulté de trouver des marqueurs d'épuisement existe toujours, et les ICP ne semblent pas être corrélés à l'épuisement des cellules NK.

En conclusion, nos travaux montrent la nécessité de freiner le surplus d'activation sans l'inhiber totalement. Par conséquent, la réactivité des cellules NK nécessite une activation optimale (ni trop forte, ni trop faible). Mais comment cibler spécifiquement le stade « épuisé » ? Ceci serait possible, par exemple, en jouant sur la dose et le schéma de traitement (les temps restant à être définis dans notre modèle).

Comme nous l'avons vu, bien que notre modèle présente certaines limites et qu'il a été établi chez la souris, l'apport qu'il pourra fournir à la communauté travaillant sur les cellules NK reste cependant conséquent. De même la poursuite du modèle mathématique permettra probablement de mieux comprendre ce processus qu'est l'épuisement.

## **5- Annexes**

### **Article 3**

**“High mTOR activity is a hallmark of reactive natural killer cells and amplifies early signaling through activating receptors”**

Marçais A, Marotel M, Degouve S, Koenig A, Fauteux-Daniel S, Drouillard A, Schlums H, Viel S, Besson L, Allatif O, Bléry M, Vivier E, Bryceson Y, Thaunat O, Walzer T.

***Elife 2017***



# High mTOR activity is a hallmark of reactive natural killer cells and amplifies early signaling through activating receptors

Antoine Marçais<sup>1,2,3,4,5\*</sup>, Marie Marotel<sup>1,2,3,4,5</sup>, Sophie Degouve<sup>1,2,3,4,5</sup>, Alice Koenig<sup>1,2,3,4,5</sup>, Sébastien Fauteux-Daniel<sup>1,2,3,4,5</sup>, Annabelle Drouillard<sup>1,2,3,4,5</sup>, Heinrich Schlums<sup>6</sup>, Sébastien Viel<sup>1,2,3,4,5,7</sup>, Laurie Besson<sup>1,2,3,4,5</sup>, Omran Allatif<sup>1,2,3,4,5</sup>, Mathieu Bléry<sup>8</sup>, Eric Vivier<sup>9,10</sup>, Yenan Bryceson<sup>6,11</sup>, Olivier Thauinat<sup>1,2,3,4,5</sup>, Thierry Walzer<sup>1,2,3,4,5\*</sup>

<sup>1</sup>CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie - International Center for Infectiology Research, Lyon, France; <sup>2</sup>Inserm, U1111, Lyon, France; <sup>3</sup>Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon, France; <sup>4</sup>Université Lyon 1, Lyon, France; <sup>5</sup>CNRS, UMR5308, Lyon, France; <sup>6</sup>Centre for Hematology and Regenerative Medicine, Department of Medicine, Karolinska Institutet, Karolinska University Hospital Huddinge, Stockholm, Sweden; <sup>7</sup>Laboratoire d'Immunologie, Hospices Civils de Lyon, Centre Hospitalier Lyon Sud, Lyon, France; <sup>8</sup>Innate-Pharma, Marseille, France; <sup>9</sup>Aix-Marseille Université, CNRS, INSERM, CIML, Marseille, France; <sup>10</sup>APHM, Hôpital de la Timone, Service d'Immunologie, Marseille, France; <sup>11</sup>Broegelmann Research Laboratory, The Gades Institute, University of Bergen, Bergen, Norway

\*For correspondence: antoine.marcais@inserm.fr (AM); thierry.walzer@inserm.fr (TW)

Competing interest: See page 18

Funding: See page 18

Received: 28 February 2017

Accepted: 29 August 2017

Published: 06 September 2017

Reviewing editor: Wayne M Yokoyama, Howard Hughes Medical Institute, Washington University School of Medicine, United States

© Copyright Marçais et al. This article is distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use and redistribution provided that the original author and source are credited.

**Abstract** NK cell education is the process through which chronic engagement of inhibitory NK cell receptors by self MHC-I molecules preserves cellular responsiveness. The molecular mechanisms responsible for NK cell education remain unclear. Here, we show that mouse NK cell education is associated with a higher basal activity of the mTOR/Akt pathway, commensurate to the number of educating receptors. This higher activity was dependent on the SHP-1 phosphatase and essential for the improved responsiveness of reactive NK cells. Upon stimulation, the mTOR/Akt pathway amplified signaling through activating NK cell receptors by enhancing calcium flux and LFA-1 integrin activation. Pharmacological inhibition of mTOR resulted in a proportional decrease in NK cell reactivity. Reciprocally, acute cytokine stimulation restored reactivity of hyporesponsive NK cells through mTOR activation. These results demonstrate that mTOR acts as a molecular rheostat of NK cell reactivity controlled by educating receptors and uncover how cytokine stimulation overcomes NK cell education.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.26423.001>

## Introduction

Natural killer (NK) cells are group 1 innate lymphoid cells characterized by their ability to kill target cells and to secrete cytokines such as IFN- $\gamma$  (*Spits et al., 2013*). Thereby, they take part in the early response against infected and neoplastic cells. Target cell recognition and NK cell activation are controlled by the balance between positive and negative signals arising from the engagement of an array of NK activating receptors (NKar) and NK inhibitory receptors (NKir). While normal cells express an excess of NKir ligands, stressed cells, such as tumor and infected cells, may lose



**eLife digest** The cells of the immune system patrol the body to detect and destroy harmful microbes and diseased cells. Natural killer cells are immune cells with a natural capacity to kill infected or cancerous cells, as their name suggests. Importantly, they do so while sparing the surrounding healthy cells.

As natural killer cells mature they go through an “education” process to learn to distinguish between normal and abnormal cells. During education, the natural killer cells interact continuously with nearby healthy cells. However, it remains unknown how these interactions change the natural killer cells, or how these changes control their killing activity.

Marçais et al. now show that a protein called mTOR is essential to the education of natural killer cells. Comparing natural killer cells that had or had not completed the education process revealed that mTOR is more active in the educated cells. Moreover, inhibiting the activity of mTOR caused educated natural killer cells to lose their ability to identify diseased cells, while stimulating mTOR activity in uneducated natural killer cells mimicked the education process, allowing them to recognize and eliminate diseased host cells.

Certain nutrients are known to control the activity of mTOR, which suggests these nutrients could also affect how natural killer cells develop. In addition, manipulating the activity of mTOR could be used to control the response of natural killer cells to diseased host cells, and so could form part of treatments for cancer and infectious diseases. However, given that mTOR plays numerous roles within different body cells, any potential therapies that are developed would need to be able to manipulate mTOR specifically in natural killer cells.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.26423.002>

expression of NKir ligands (‘missing-self’) or acquire expression of NKar ligands (‘modified-self’), thus tilting the balance towards activation. NKirs, which mostly recognize classical or non-classical MHC-I molecules, are stochastically expressed, resulting in a variegated expression pattern. Depending on the species, three types of NKir interact with MHC-I: Killer Immunoglobulin-like Receptors (KIR) in primates, Ly49 receptors of the lectin-like family in rodents and the heterodimer formed by CD94 and NKG2A in these species (**Vivier et al., 2008**).

In addition, considerable functional heterogeneity is observed in the NK cell population. Such cell intrinsic differences led to the proposition that NK cell reactivity and consequently their ability to discriminate self from non-self is the result of an education process (**Anfossi et al., 2006; Fernandez et al., 2005; Kim et al., 2005**). There was however considerable debate over the molecular process leading to education. Two theories were crafted to account for these observations: the first one proposing that a priming (or arming) signal was required to confer reactivity to otherwise hyporesponsive cells, the second positing that responsiveness is a default state that is lost upon unopposed chronic stimulation of NKar (disarming) (**Höglund and Brodin, 2010**). The data accumulated so far are in favor of the latter model, suggesting that intrinsic reactivity is lost upon chronic engagement of NKar unless this is opposed by concomitant engagement of NKir. Indeed, there is no evidence so far that priming signals are a prerequisite for acquisition of responsiveness. In contrast, disarming is the simplest explanation to account for the tolerance to self of NK cells raised in a mosaic or chimeric environment (**Johansson et al., 1997; Wu and Raulet, 1997**). Moreover, the loss of reactivity consequent to exposure of NK cells to activating ligands functionally demonstrates the possibility to disarm reactive NK cells (**Oppenheim et al., 2005; Tripathy et al., 2008**).

At the molecular level, physical interaction between NKirs and their ligands is required to maintain responsiveness as (1) only NK cells expressing NKir engaged by MHC-I at the surface of surrounding cells are reactive and as (2) NK cells expressing NKirs but developing in MHC-I deficient humans or animals are functionally impaired (**Fernandez et al., 2005; Kim et al., 2005; Zimmer et al., 1998**). In addition, the inhibitory signaling module acting downstream of NKirs is required to maintain reactivity. Indeed, mutation of the immunoreceptor tyrosine-based motifs (ITIM) of inhibitory Ly49 molecules or deficiency in the phosphatase SHP-1, recruited to NKirs upon ligation, decreases responsiveness (**Kim et al., 2005; Viant et al., 2014**). Inhibition of the activating signal by NKir thus serves two-distinct but related purposes: it counters inappropriate NK cell

activation and it prevents the desensitization induced by chronic stimulation thereby preserving NK cell reactivity. In inbred C57BL/6 mice, Ly49C (specific for H2-K<sup>b</sup>), Ly49I (specific for H2-K<sup>b</sup>) and the CD94/NKG2A receptor (specific for a D<sup>b</sup> peptide presented by Qa-1) have been shown to interact with substantial affinity with self-MHC class I molecules, while other receptors show no or marginal affinity (Hanke et al., 1999; Michaëlsson et al., 2000; Vance et al., 1998). Consequently, NK cell populations expressing these receptors are educated in C57BL/6 mice, that is, they are more reactive than their non-educated counterparts (Fernandez et al., 2005; Joncker et al., 2009; Kim et al., 2005). Education is a dynamic process tuned by the number of engaged NKirs and the strength of each interaction in a rheostat-like manner (Brodin et al., 2009a; Johansson et al., 2005; Joncker et al., 2009). It is also reversible in as little as one or two days as shown in different experimental set-ups (Ebihara et al., 2013; Elliott et al., 2010; Joncker et al., 2010). This suggests the existence of a potent cellular process integrating activating and inhibitory educating signals of variable strength (i.e. the strength of the NKar or NKir-ligand interaction and number of different interactions over time) and controlling the display of effector functions in response to NKar stimulation.

Previous studies have shown that reactive NK cells are characterized by stronger calcium flux and LFA-1 integrin activation upon NKar stimulation (Guia et al., 2011; Thomas et al., 2013). However, the nature of the molecular process conditioning NK cell reactivity and negatively affected by chronic engagement of NKar is unknown. To address this question, we systematically compared phosphorylation levels of key molecules involved in immunoreceptor tyrosine-based activating motif (ITAM) signaling in reactive vs. hyporesponsive NK cells at steady-state and following NKar stimulation. We discovered that NK cell reactivity is associated with a higher basal activity of the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway. Our genetic and pharmacological approaches collectively demonstrate a prominent role of mTOR signaling in controlling steady-state NK cell responsiveness.

## Results

### Reactive NK cells display higher activity of the Akt/mTOR pathway at steady-state and following acute NKar engagement

Seeking to identify molecular pathways involved in NK cell education, we systematically screened the basal levels of 20 phosphorylations on 16 proteins involved in ITAM signaling between reactive and hyporesponsive NK cells by flow cytometry (complete list in Table 1). This flow-cytometry based approach allowed us to combine the advantages of single-cell analysis and comparison of equivalent cell subset thanks to electronic gating. In C57BL/6 mice, the main educating NKirs are NKG2A and Ly49C, defining four subsets of which the double-negative display the lowest, the double-positive the highest and the single positives an intermediate responsiveness (Joncker et al., 2009). We also analyzed *B2m*<sup>-/-</sup> NK cells that are uniformly unreactive. Most of these phosphorylations are developmentally regulated (Figure 1—figure supplement 1), thus, to exclude any developmental bias, we compared similar developmental stages defined by CD11b and CD27 (Figure 1—figure supplement 2). Strikingly, all analyzed phosphorylations in the Akt/mTOR pathway correlated positively with the level of NK cell reactivity (Figure 1A). This was true when comparing C57BL/6 and *B2m*<sup>-/-</sup> NK cells as well as reactive and unreactive populations in C57BL/6 mice, regardless of the maturation stage. In C57BL/6 populations, absence of either NKG2A or Ly49C had a measurable negative effect, the absence of both leading to further decrease in the phosphorylation level. We also noted a significant correlation between education status and the level of pNFκB S529 and S468 as well as pLck Y505 and pItk Y180 (Figure 1A). However, as the most consistent differences lied in the Akt/mTOR pathway, we decided to focus our analysis on this pathway.

The phosphatase SHP-1 is required to maintain an optimal NK cell reactivity (Viant et al., 2014). To test its involvement in the maintenance of the basal activity of the Akt/mTOR pathway, we measured the phosphorylation levels of the ribosomal S6 protein and Akt in NK cells deficient in *Ptpn6*, the gene encoding SHP-1. As a control, we also measured the level of phosphorylation of STAT5 in these cells. The basal activity of the Akt/mTOR pathway was specifically decreased in NK cells from *Ncr1*<sup>Cre/+</sup> *Ptpn6*<sup>lox/lox</sup> mice compared to control NK cells while pSTAT5 levels were unchanged (Figure 1B). Thus, basal activation of the Akt/mTOR pathway is correlated with NK cell reactivity and controlled by SHP-1-dependent signaling downstream of NKirs.

**Table 1.** List of the antibodies used in this study and the phosphoepitopes they recognize.

Phosphoepitope	Clone (Supplier)
pCD3 $\zeta$ (Y142)	K25-407.69 (BD)
pLck (Y505)	4/LCK-Y505 (BD)
pSyk (Y342)	I120-722 (BD)
pSLP76 (Y128)	J141-668.36.58 (BD)
pIrk (Y180)	N35-86 (BD)
pPLC $\gamma$ 2 (Y759)	K86-689.37 (BD)
pWIP (S478)	K32-824 (BD)
p-p38 (T180/Y182)	36/p38 (pT180/pY182) (BD)
pERK1/2 (T203/Y205)	20A (BD)
p-c-Cbl (Y698)	47/c-Cbl (BD)
pJNK (T183/Y185)	N9-66 (BD)
pNFkB p65 (S468)	#3039 (CST)
pNFkB p65 (S529)	K10-895.12.50 (CST)
pNFkB p65 (S536)	93H1 (CST)
pAkt (T308)	C31E5E (CST)
pAkt (S473)	M89-61 (BD)
pS6 (S235/236)	D57.2.2E (CST)
p4EBP1 (T36/45)	236B4 (CST)
p-mTOR (S2448)	D9C2 (CST)
p-mTOR (S2481)	#2974 (CST)

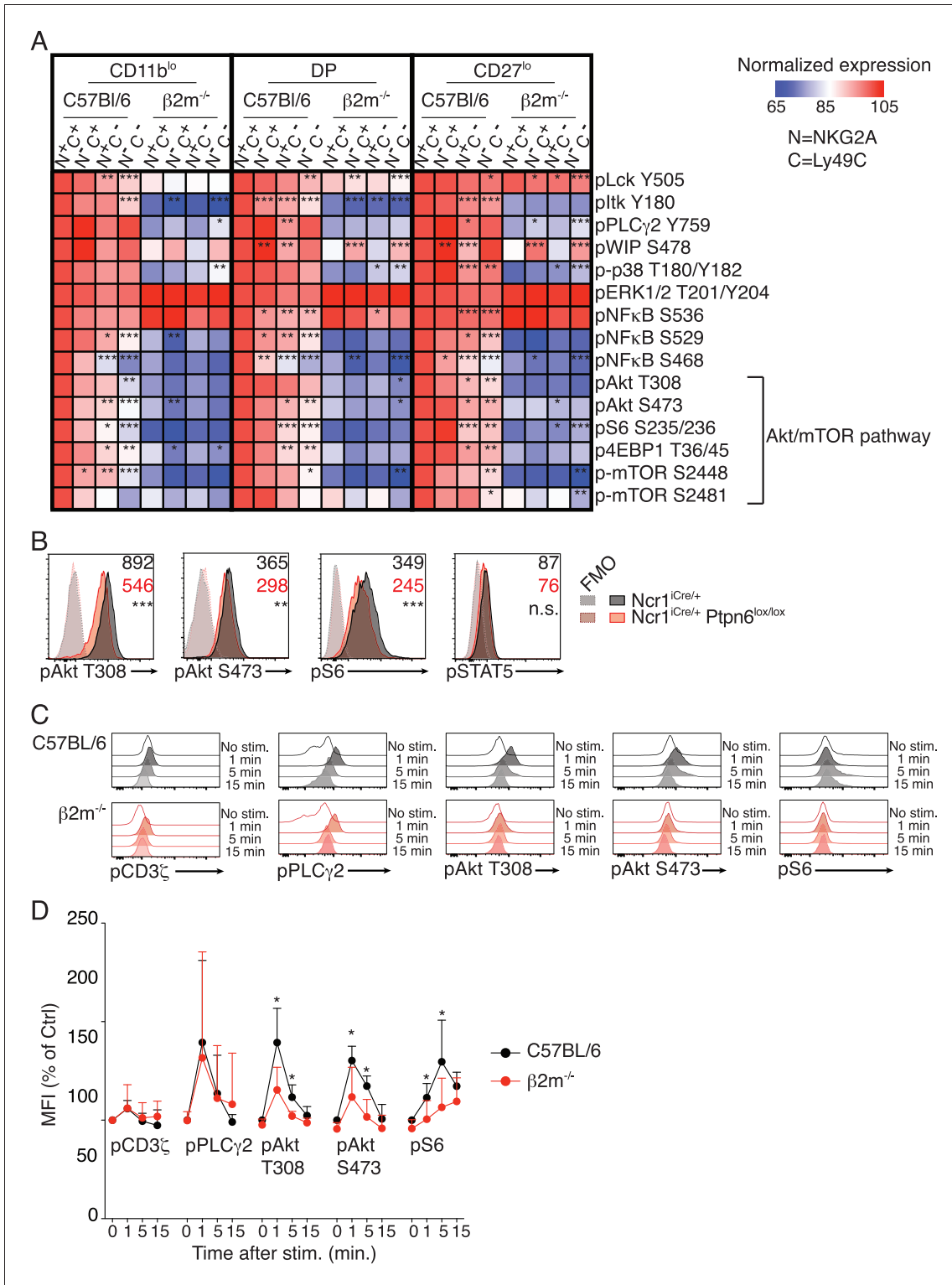
DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.26423.007>

We next compared mTOR-related signaling events arising from NKAr stimulation in reactive versus hyporesponsive NK cells. To this end, we stimulated splenocytes from C57BL/6 (around 85% of NK cells are reactive in these mice) and  $B2m^{-/-}$  mice by crosslinking NK1.1 and we measured phosphorylation events over time. Phosphorylation of Akt on T308 and S473 and phosphorylation of the ribosomal protein S6 were induced at higher levels in reactive NK cells compared to hyporesponsive NK cells (**Figure 1C,D**). By contrast, other signaling events not linked to the mTOR pathway were induced at similar levels (**Figure 1C,D** and **Figure 1—figure supplement 3**).

In summary, high activity of the Akt/mTOR pathway is a hallmark of reactive NK cells both at steady-state and following stimulation through NKAr. Importantly, considering that education is not a discrete but rather a continuous process, absence of one or two of the educating NKAr in C57BL/6 resulted in a commensurate loss in mTOR activity.

### Chronic NK cell stimulation results in decreased phosphorylation of the Akt/mTOR pathway which parallels the loss of reactivity

Education is rapidly reverted by unopposed chronic stimulation. Indeed, transfer of reactive NK cells into a host devoid of MHC-I leads to their rapid loss of reactivity and to their tolerance to MHC-I negative cells (**Joncker et al., 2010**). We thus sought to test whether chronic NKAr stimulation decreased the activity of the Akt/mTOR pathway in parallel with the decrease of reactivity. To this purpose, we transferred reactive C57BL/6 NK cells into control C57BL/6 or  $B2m^{-/-}$  mice and measured basal Akt/mTOR phosphorylation levels and their reactivity 3 days after transfer. To quantify the intensity of NKAr signaling, we took advantage of a transcriptional reporter of the TCR signaling (**Moran et al., 2011**). This reporter consists of a GFP under the control of the promoter sequence of *Nur77*, an orphan nuclear receptor strongly induced in response to TCR stimulation. The signaling pathways triggered by TCR or NKAr engagement mobilizing the same signaling adaptors, we reasoned that the *Nur77*<sup>GFP</sup> construct might also report NKAr triggering. Indeed, in vitro stimulation with an NK1.1 agonist antibody or YAC-1 cells, a lymphoblastic cell line detected as foreign by C57BL/6 NK cells, resulted in an increase in the GFP fluorescence (**Figure 2—figure supplement 1**).



**Figure 1.** Basal activity of the mTOR pathway is proportional to the level of NK cell reactivity, and dependent on SHP1. (A) Heatmap representing the phosphorylation level of the phosphoepitopes indicated on the right in the different subsets of splenic resting NK cells indicated on top and gated as defined in **Figure 1—figure supplement 2**. Mean Fluorescence Intensity was recorded for each phosphoepitope in each subset. Normalized expression was calculated using the N<sup>+</sup>C<sup>+</sup> subset of C57BL/6 mice as reference, as described in the Materials and Methods. The mean values are shown (n = 6 mice of each genotype in three independent experiments, adjusted p-values were calculated as described in the Materials and methods *Figure 1 continued on next page*

Figure 1 continued

and compare the  $N^+C^+$  subset to the indicated subset, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ). (B) Histograms representing the phosphorylation level of the indicated proteins in splenic resting NK cells from  $Ncr1^{Cre/+}$  or  $Ncr1^{Cre/+} Ptpn6^{lox/lox}$  mice (representative of 5 mice of each genotype in three independent experiments, t-test, \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ , n.s. non significant). The MFI are indicated, in black for the  $Ncr1^{Cre/+}$  NK cells and in red for the  $Ncr1^{Cre/+} Ptpn6^{lox/lox}$  NK cells. (C–D) Phosphorylation level of the indicated phospho-epitope in splenic NK cells from C57BL/6 or  $B2m^{-/-}$  mice following NK1.1 stimulation for the indicated time. (C) Histogram overlays from one representative experiment. (D) MFI of the indicated phospho-epitope (mean +SD) of 5 mice of each genotype in five independent experiments (t-test, \* $p < 0.05$ ).

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.26423.003>

The following figure supplements are available for figure 1:

**Figure supplement 1.** Bar graph showing the phosphorylation level of the indicated phosphoepitopes in the different subsets of splenic resting C57BL/6 NK cells defined by their expression of CD27 and CD11b.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.26423.004>

**Figure supplement 2.** Flow cytometry density plots presenting the analysis strategy to compare educated versus uneducated NK cells in C57BL/6 mice and the phenotypically equivalent subsets in  $B2m^{-/-}$  mice.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.26423.005>

**Figure supplement 3.** Phosphorylation level of phospho-epitopes defined in **Table 1** was measured by flow-cytometry in splenic NK cells from C57BL/6 or  $B2m^{-/-}$  mice following NK1.1 stimulation for the indicated time.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.26423.006>

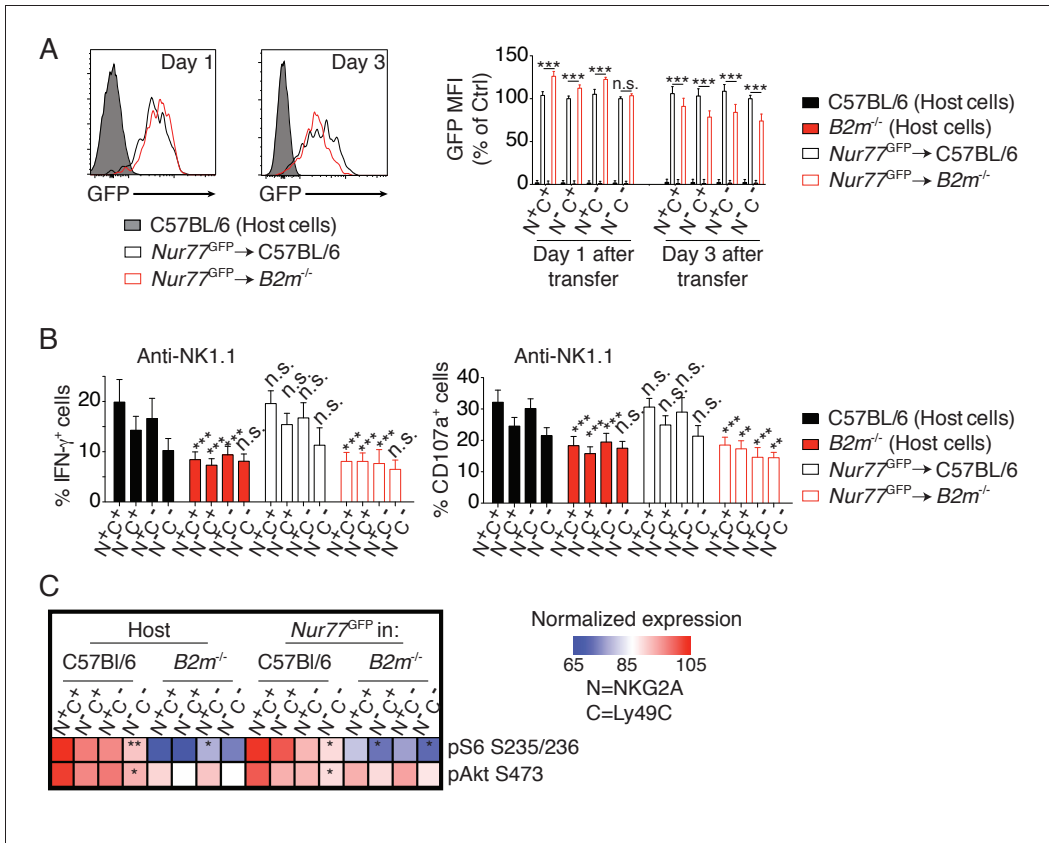
Moreover, this increase was commensurate with reactivity so that higher GFP levels were reached in reactive  $NKG2A^+Ly49C^+$  NK cells, thus validating the expression of GFP as a reporter of NKAR stimulation. Transfer of  $Nur77^{GFP}$  cells into  $B2m^{-/-}$  mice resulted in a transient increase in the GFP level in the reactive subsets one day after transfer indicative of ongoing NKAR signaling (**Figure 2A**). Interestingly, this was followed, 3 days after transfer, by a significant decrease in steady-state GFP level indicative of a loss of the cell capacity to signal following NKAR stimulation. As previously reported, NK cells transferred into  $B2m^{-/-}$  mice lost their reactivity while reactivity was maintained upon transfer into C57BL/6 host (**Figure 2B**, anti-NK1.1 stimulation and **Figure 2—figure supplement 2**, anti-NKp46 or YAC1 stimulation). Importantly, this was paralleled by a decrease in the phosphorylation of S6 and Akt S473 and a loss of the gradient observed between the different subsets expressing Ly49C and NKG2A (**Figure 2C**).

Collectively, these results demonstrate that the basal activity of the Akt/mTOR pathway is negatively affected by persistent and unopposed NKAR stimulation. This suggests that engagement of Ly49C and NKG2A in C57BL/6 mice preserves Akt/mTOR basal activity resulting in higher basal phosphorylation in the NK cell population expressing these NKIR.

## mTOR is essential for NK cell reactivity

To test if high mTOR activity was required for NK cell reactivity, we stimulated NK cells from  $Ncr1^{Cre/+} Mtor^{lox/lox}$  or control mice with plate-bound anti-NK1.1 antibody or YAC-1 cells and measured NK cell degranulation relative to the expression of the major educating receptors Ly49C and NKG2A. Control NK cells responded significantly better than mTOR-deficient NK cells, irrespective of the subset analyzed (**Figure 3A**). Moreover, within control NK cells, reactive  $Ly49C^+NKG2A^+$  degranulated more than the other subsets, while mTOR deficiency resulted in equally hyporesponsive subsets.

These results suggested a major role of mTOR in NK cell reactivity. However, mTOR deficiency leads to a severe NK cell developmental block that may confound the interpretation of the results (**Marçais et al., 2014**). To address this issue we took advantage of Torin2, a highly selective ATP-competitive mTOR inhibitor targeting both mTORC1 and mTORC2 (**Liu et al., 2011**). We stimulated mature NK cells from C57BL/6 and  $B2m^{-/-}$  mice with plate-bound anti-NK1.1 in the presence or absence of the inhibitor. Torin2 significantly decreased the capacity of C57BL/6 NK cells to produce IFN- $\gamma$  and to degranulate upon stimulation, regardless of the subset analyzed (**Figure 3B**). Moreover, treatment of C57BL/6 NK cells with Torin2 abrogated the differences between highly reactive ( $Ly49C^+NKG2A^+$ ) and hyporesponsive ( $Ly49C^-NKG2A^-$ ) cells. Treatment of hyporesponsive  $B2m^{-/-}$  NK cells led to a further decrease in their capacity to degranulate while their production of IFN- $\gamma$  was unaffected. Similar results were obtained upon NKp46 stimulation (**Figure 3—figure supplement 1**). Torin2 treated C57BL/6 NK cells thus functionally behaved like  $B2m^{-/-}$  hyporesponsive NK



**Figure 2.** Reversion of education is accompanied by loss of the basal activity of the mTOR pathway. (A) Left: Representative histograms showing the GFP fluorescence levels of *Nur77<sup>GFP</sup>* NK cells transferred into C57BL/6 or *B2m<sup>-/-</sup>* mice and harvested 1 or 3 days after transfer. Non-transgenic host cells are shown. Right: Bar graph showing the GFP levels of the indicated splenic NK cell subsets normalized to the N<sup>+</sup>C<sup>+</sup> population of *Nur77<sup>GFP</sup>* NK cells transferred into C57BL/6 control mice (mean +SD, n = 6 mice of each genotype per time point in two independent experiments, two-way ANOVA; \*\*\*p<0.001, n.s. non significant). (B) Percentage (mean + SD) of IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> or CD107a<sup>+</sup> cells among splenic host or transferred NK cells of the indicated subset following a 4 hr stimulation with coated anti-NK1.1. The experiment was done 3 days after transfer (n = 6 mice of each genotype in two independent experiments, two-way ANOVA comparing each subset to its counterpart in C57BL/6 mice, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, n.s. non significant). (C) Heatmap representing the phosphorylation level of the phosphoepitopes indicated on the right in the different subsets of splenic resting NK cells indicated on top. Mean Fluorescence Intensity was recorded for each phosphoepitope in each subset. Normalized expression was calculated using the N<sup>+</sup>C<sup>+</sup> subset of C57BL/6 host NK cells as reference. The mean values are shown (n = 6 mice of each genotype in two independent experiments, t-tests comparing the N<sup>+</sup>C<sup>+</sup> subset to the indicated subset, \*p<0.05, \*\*p<0.01).

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.26423.008>

The following figure supplements are available for figure 2:

**Figure supplement 1.** Left: Representative histograms showing the GFP fluorescence levels of *Nur77<sup>GFP</sup>* NK cells before or after a 4 hr stimulation with anti-NK1.1 or YAC-1 cells.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.26423.009>

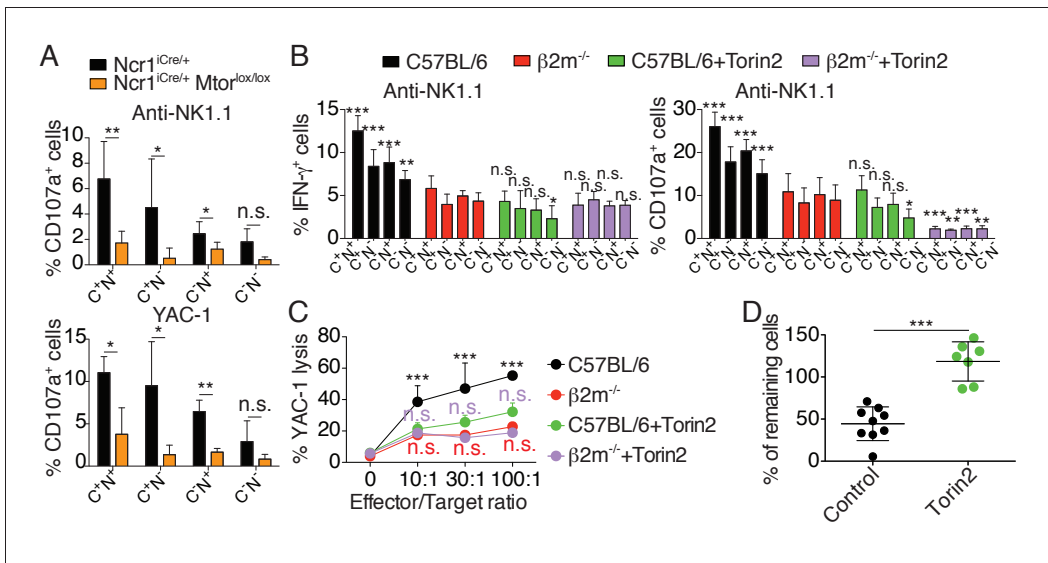
**Figure supplement 2.** Percentage (mean +SD) of IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> or CD107a<sup>+</sup> cells among splenic host or transferred NK cells of the indicated subset following 4 hr stimulation with (A) coated anti-NKp46 or (B) YAC-1 cells.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.26423.010>

cells. Similarly, Torin2 inhibited C57BL/6 NK cells from triggering YAC-1 lysis at a similar level seen in hyporesponsive *B2m<sup>-/-</sup>* NK cells (Figure 3C). Torin2 treatment had no effect on the lytic capacity of *B2m<sup>-/-</sup>* NK cells.

Education conditions the phenomenon of missing-self recognition. A classical readout to highlight this property is to measure the rate of rejection of MHC-I negative target cells in vivo. To test whether basal activity of the Akt/mTOR pathway was involved in this process, we transferred a mix of C57BL/6 and NK-sensitive MHC-I negative (*B2m<sup>-/-</sup>*) target cells into C57BL/6 mice, previously





**Figure 3.** mTOR is essential for NK cell reactivity. (A) Percentage (mean +SD) of CD107a<sup>+</sup> cells among splenic CD11b<sup>lo</sup> NK cells of the indicated subset from *Ncr1<sup>iCre/+</sup>* or *Ncr1<sup>iCre/+</sup> Mtor<sup>lox/lox</sup>* mice following 4 hr stimulation with coated anti-NK1.1 or YAC-1 cells (n = 5 mice of each genotype in three independent experiments, t-tests comparing each subset in both genotype, \*p<0.05, \*\*p<0.01, n.s. non significant). (B) Percentage (mean +SD) of IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> or CD107a<sup>+</sup> cells among splenic NK cells of the indicated subset from C57BL/6 or *B2m<sup>-/-</sup>* mice following 4 hr stimulation with coated anti-NK1.1 in the presence or absence of 250 nM Torin2 (n = 9–10 mice of each genotype in five independent experiments, two-way ANOVA comparing each subset to its counterpart in *B2m<sup>-/-</sup>* mice, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, n.s. non significant). (C) Percentage (mean +SD) of dead YAC-1 cells after a 4 hr co-culture with purified NK cells of the indicated genotype at the indicated Effector/Target ratio in the presence or absence of 250 nM Torin2 (n = 9 C57BL/6 and 7 *B2m<sup>-/-</sup>* mice in four independent experiments, two-way ANOVA comparing each E/T ratio of C57BL/6 + Torin2 to C57BL/6, *B2m<sup>-/-</sup>* or *B2m<sup>-/-</sup>* +Torin2 as indicated by the color, \*\*\*p<0.001, n.s. non significant). (D) Percentage of remaining *B2m<sup>-/-</sup>* target cells following in vivo cytotoxicity experiment as described in the Materials and methods. Each dot represents a single mouse, bars indicate mean and SD (n = 9 control treated mice and 7 Torin2 treated mice in two independent experiments, t-test, \*\*\*p<0.001).

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.26423.011>

The following figure supplement is available for figure 3:

**Figure supplement 1.** Percentage (mean +SD) of IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> or CD107a<sup>+</sup> cells among splenic NK cells of the indicated subset from C57BL/6 or *B2m<sup>-/-</sup>* mice following 4 hr stimulation with coated anti-NKp46 in the presence or absence of 250 nM Torin2 (n = 9–10 mice of each genotype in five independent experiments, 2-way ANOVA comparing each subset to its counterpart in *B2m<sup>-/-</sup>* mice, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, n.s. non significant).

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.26423.012>

treated or not with Torin2. While injection into control mice led to the disappearance of 50% of the target cells, this rejection was abrogated in Torin2 treated animals, underlining the importance of mTOR activity in NK cell recognition of missing-self under steady-state conditions (**Figure 3D**).

Altogether, these results demonstrate that mTOR is required for NK cell reactivity.

### mTOR is a rheostat of NK cell reactivity through NKAr

The ‘rheostat’ model of education proposes that the strength of the MHC-I input translates into a quantitative modification of NK cell responsiveness (**Brodin et al., 2009b**). Indeed, several studies reported that the higher the number of self-MHC-I receptors expressed by NK cells interacting with their ligands, the stronger their responsiveness (**Brodin et al., 2009a; Johansson et al., 2005; Joncker et al., 2009**). As shown in **Figure 1**, the level of mTOR activity was tightly correlated with the number of educating NKirs in NK cells, suggesting that mTOR could serve as the molecular rheostat translating the MHC-I input into quantitative tuning of the responsiveness. To directly test this point, we analyzed how the ex vivo modulation of mTOR activity by pharmacologic mTOR inhibitors changed NK cell responsiveness. We took advantage of four different inhibitors of graded mTOR inhibitory potential: the macrolide Rapamycin that primarily inhibits mTORC1 and three ATP-competitive inhibitors targeting both mTORC1 and mTORC2 to a varying extent: AZD2014, KU-0063794 (KU) and Torin2 (**García-Martínez et al., 2009; Guichard et al., 2015; Liu et al., 2011;**

*Sabatini et al., 1994; Yang et al., 2013*). The use of different concentrations of those compounds allowed us to modulate mTOR activity in NK cells over a dynamic range of 10-fold for mTORC1 or 2-fold for mTORC2 as measured by phosphorylation of S6 and Akt S473 respectively (**Figure 4A**). Of note, we confirmed that Rapamycin acted specifically on mTORC1 while AZD, KU and Torin2 inhibited both complexes. Importantly, at these concentrations no significant changes in STAT5 phosphorylation or specific toxicity over a 24 hr incubation period were noted (**Figure 4—figure supplement 1A and B**). We then correlated the S6 and Akt phosphorylation levels to the IFN- $\gamma$  production and degranulation induced by NK1.1 crosslinking. S6 phosphorylation was positively correlated with the effector functions in all conditions tested (**Figure 4B**). Similar correlations were found between Akt phosphorylation and effector function upon AZD, KU or Torin2 treatment (**Figure 4C**). However, this correlation was lost upon Rapamycin treatment, suggesting that mTORC2 activity alone is not sufficient to sustain effector functions (**Figure 4B,C**). In addition, effector functions were not correlated to STAT5 phosphorylation levels (**Figure 4—figure supplement 1B,C**). Similar results were obtained upon stimulation of NK cells from *Ncr1<sup>iCre</sup>* and *Ncr1<sup>iCre</sup> Mtor<sup>lox/lox</sup>* mice and measure of the phosphorylation levels of the S6 and Akt proteins in parallel thus genetically confirming the results (**Figure 4—figure supplement 1D**).

Overall, these results demonstrate that mTOR acts as a molecular rheostat of NK cell responsiveness. Together with results in **Figures 1** and **2**, they demonstrate that NK cell education relies on the modulation of mTOR activity that in turn controls NK cell responsiveness through NKars.

### mTOR is essential for calcium response and integrin activation in NK cells following NKar engagement

Next, we asked whether mTOR activity could regulate signaling via NKar. Previous studies established that reactive NK cells display higher calcium flux (*Guia et al., 2011*) and higher integrin activation than hyporesponsive NK cells (*Thomas et al., 2013*). Hence we sought to test the impact of mTOR activity on these cardinal events in lymphocyte activation. We first measured the calcium flux in real time by flow cytometry following NK1.1 stimulation using fluorescent calcium probes and we quantified the intensity of the fluorescence peak. When we challenged *Ncr1<sup>iCre/+</sup>* (control) and *Ncr1<sup>iCre/+</sup> Mtor<sup>lox/lox</sup>* NK cells, NK1.1 cross-linking resulted in a detectable calcium flux in NK cells of both genotypes (**Figure 5A**). However, the peak was lowered (15–20%) in the absence of mTOR. We next applied the same protocol to control C57BL/6 NK cells in the presence or absence of Torin2 to acutely inhibit mTOR. As shown in **Figure 5B**, mTOR inhibition resulted in a decreased calcium flux characterized by a 20%-decrease in the peak intensity, thus phenocopying the impact of mTOR deficiency.

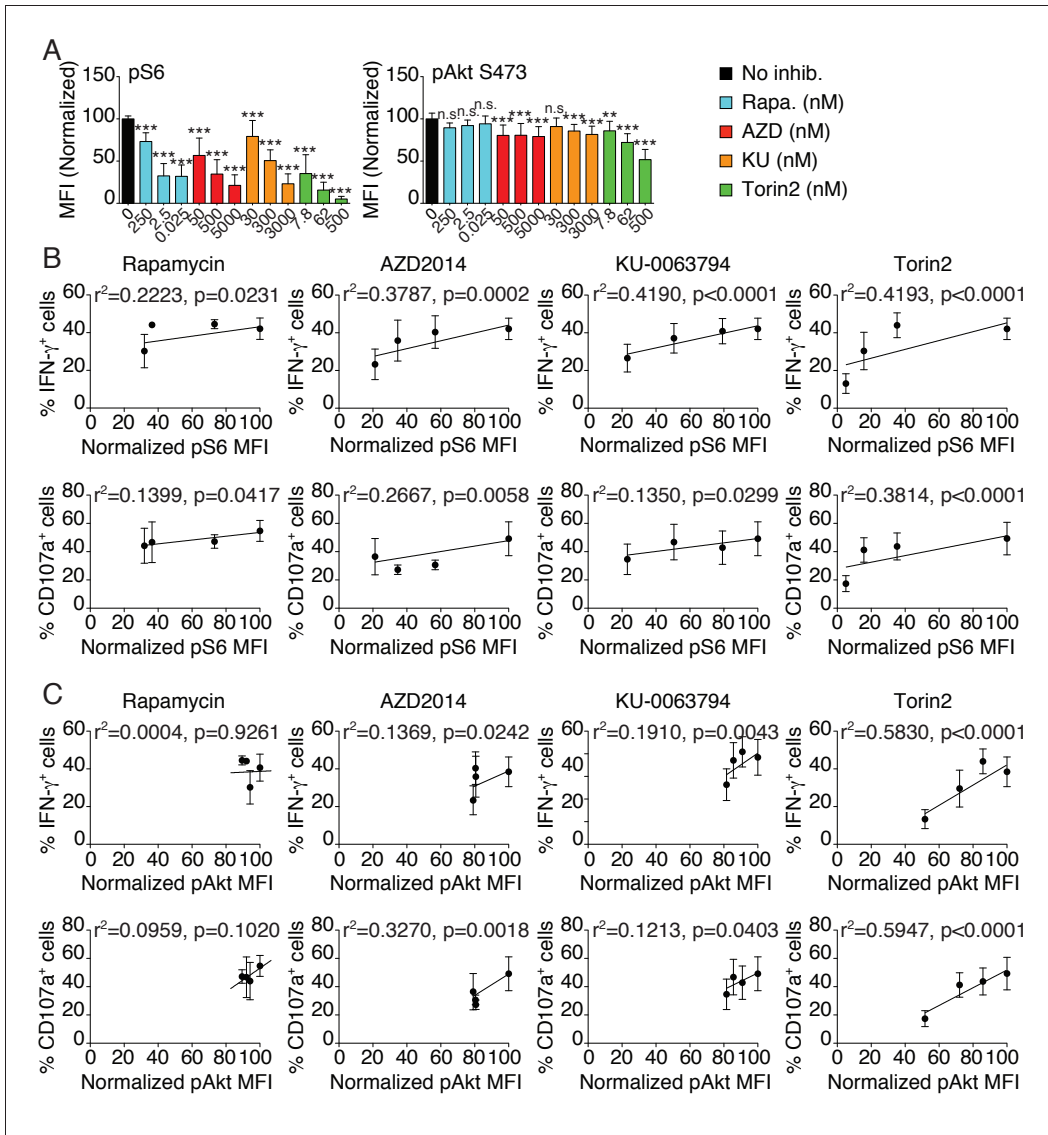
Next, we assessed the effect of mTOR deficiency on LFA-1 integrin activation following NKar triggering of inside-out signaling. For this purpose, we incubated NK cells from *Ncr1<sup>iCre/+</sup>* and *Ncr1<sup>iCre/+</sup> Mtor<sup>lox/lox</sup>* mice with beads coated with ICAM-1, the ligand of LFA-1, in the presence or absence of NK1.1 cross-linking. At different times, we measured by flow-cytometry the percentage of beads-associated NK cells as an indicator of LFA-1 activation in NK cells. As shown in **Figure 5C**, NK1.1 cross-linking failed to induce LFA-1 activation in mTOR-deficient NK cells contrary to control NK cells. In parallel, we also tested the effect of acute mTOR inhibition on LFA-1 activation in mature educated NK cells. As shown in **Figure 5D**, addition of Torin2 resulted in significant inhibition of LFA-1 activation induced by NK1.1 stimulation.

Thus, using genetic and pharmacological tools, we showed that the mTOR pathway lies upstream of two signaling events, calcium flux and LFA-1 integrin activation, which are elevated in reactive NK cells.

### Metabolic parameters of reactive and hyporesponsive NK cells

mTOR is a well-known regulator of the cell metabolism. We thus asked whether the higher activity of mTOR measured in reactive NK cells resulted in detectable changes in metabolic activity. We first measured cell size and granularity using the FSC and SSC flow-cytometry parameters. Reactive NK cells from C57BL/6 control mice presented a slight but significant increase of both morphological indicators when compared to hyporesponsive NK cells of *B2m<sup>-/-</sup>* mice (**Figure 6A**). Similarly, their mitochondrial content as well as glucose and fatty-acid uptake capacities estimated by measure of the uptake of the glucose fluorescent analog 2-NBDG or the fatty-acid fluorescent analog Bodipy





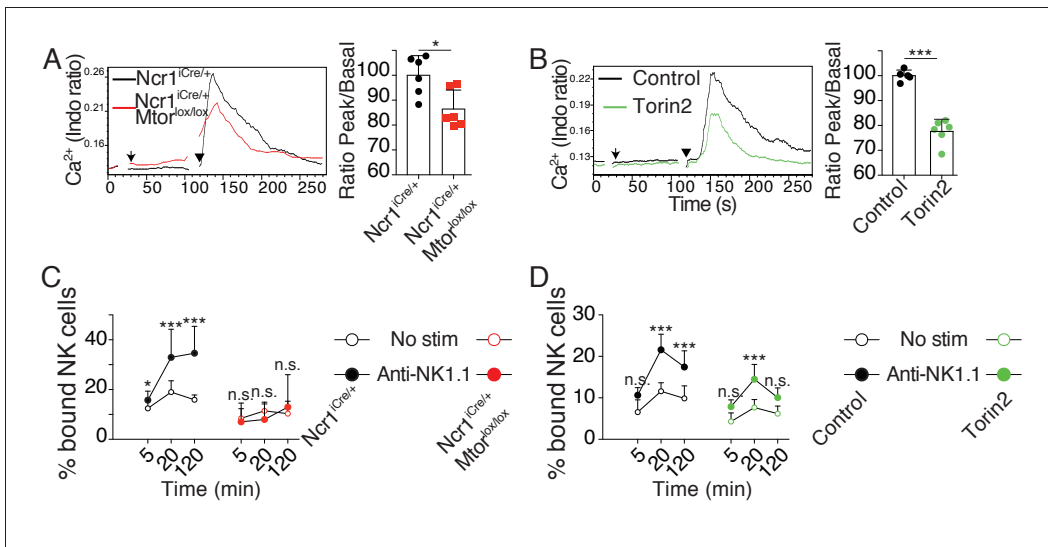
**Figure 4.** mTOR is a rheostat of NK cell reactivity through NKAr. (A) Bar graph showing the phosphorylation level of S6 (left) and Akt S473 (right) in splenic NK cells following 1 hr treatment with 100 ng/ml IL-15 in the presence or absence of the indicated mTOR inhibitors at the indicated concentration (mean of the MFI normalized to the No inhibitor condition +SD, n = 9 mice in three independent experiments, one-way ANOVA comparing the No inhibitor condition with the indicated condition, \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001, n.s. non significant). (B–C) Linear regression plots showing the correlation between (B) pS6 or (C) pAkt S473 as indicated and the percentage of IFN- $\gamma^+$  or CD107a $^+$  NK cells following 4 hr stimulation with coated anti-NK1.1 in the presence of 100 ng/ml IL-15 and mTOR inhibitors (mean  $\pm$ SD, n = 9 mice in three independent experiments, the  $r^2$  and p-value calculated by linear regression are indicated).

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.26423.013>

The following figure supplement is available for figure 4:

**Figure supplement 1.** Bar graphs showing (A) the phosphorylation level of STAT5 in splenic NK cells following 1 hr treatment with 100 ng/ml IL-15 or (B) the percentage of live NK cells following a 24 hr culture in the presence or absence of the indicated mTOR inhibitors at the indicated concentration (A) mean of the MFI normalized to the No inhibitor condition or (B) percentage of live cells + SD, n = 9 mice in three independent experiments for pSTAT5 and 4 mice in two independent experiments for Viability, one-way ANOVA comparing the No inhibitor condition with the indicated condition, n.s. non significant).

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.26423.014>



**Figure 5.** mTOR is essential for calcium response and integrin activation following NK cell engagement. (A) *Left:* Representative histogram overlay showing the  $\text{Ca}^{2+}$  flux intensity in splenic  $\text{CD11b}^{\text{lo}}$  NK cells from  $\text{Ncr1}^{\text{Cre/+}}$  or  $\text{Ncr1}^{\text{Cre/+}} \text{Mtor}^{\text{lox/lox}}$  mice. NK cells were activated following incubation with biotinylated anti-NK1.1 (Arrow) followed by cross-linking with streptavidin (Arrowhead). *Right:* Bar graph showing the Ratio Peak/basal normalized to the ratio of control NK cells (mean  $\pm$ SD, t-test  $^*p < 0.05$ ). (B) *Left:* Representative histogram overlay showing the  $\text{Ca}^{2+}$  flux intensity in splenic NK cells from C57BL/6 mice in the presence or absence of 500 nM Torin2. *Right:* Bar graph showing the Ratio Peak/basal normalized to the ratio of control NK cells (mean  $\pm$ SD, t-test  $^{***}p < 0.001$ ). (C) Percentage of splenic  $\text{CD11b}^{\text{lo}}$  NK cells from  $\text{Ncr1}^{\text{Cre/+}}$  or  $\text{Ncr1}^{\text{Cre/+}} \text{Mtor}^{\text{lox/lox}}$  mice bound to beads coated with ICAM-1 after the indicated incubation time with or without NK1.1 stimulation (mean  $\pm$ SD,  $n = 6$  mice of each genotype in four independent experiments, two-way ANOVA comparing the conditions with or without NK1.1 stimulation, n.s. non significant,  $^{**}p < 0.01$ ,  $^{***}p < 0.001$ ). (D) Percentage of splenic C57BL/6 NK cells bound to beads coated with ICAM-1 after the indicated incubation time with or without NK1.1 stimulation, in the presence or absence of 250 nM Torin2 (mean  $\pm$ SD,  $n = 6$  mice in four independent experiments, two-way ANOVA comparing the conditions with or without NK1.1 stimulation, n.s. non significant,  $^{***}p < 0.001$ ).

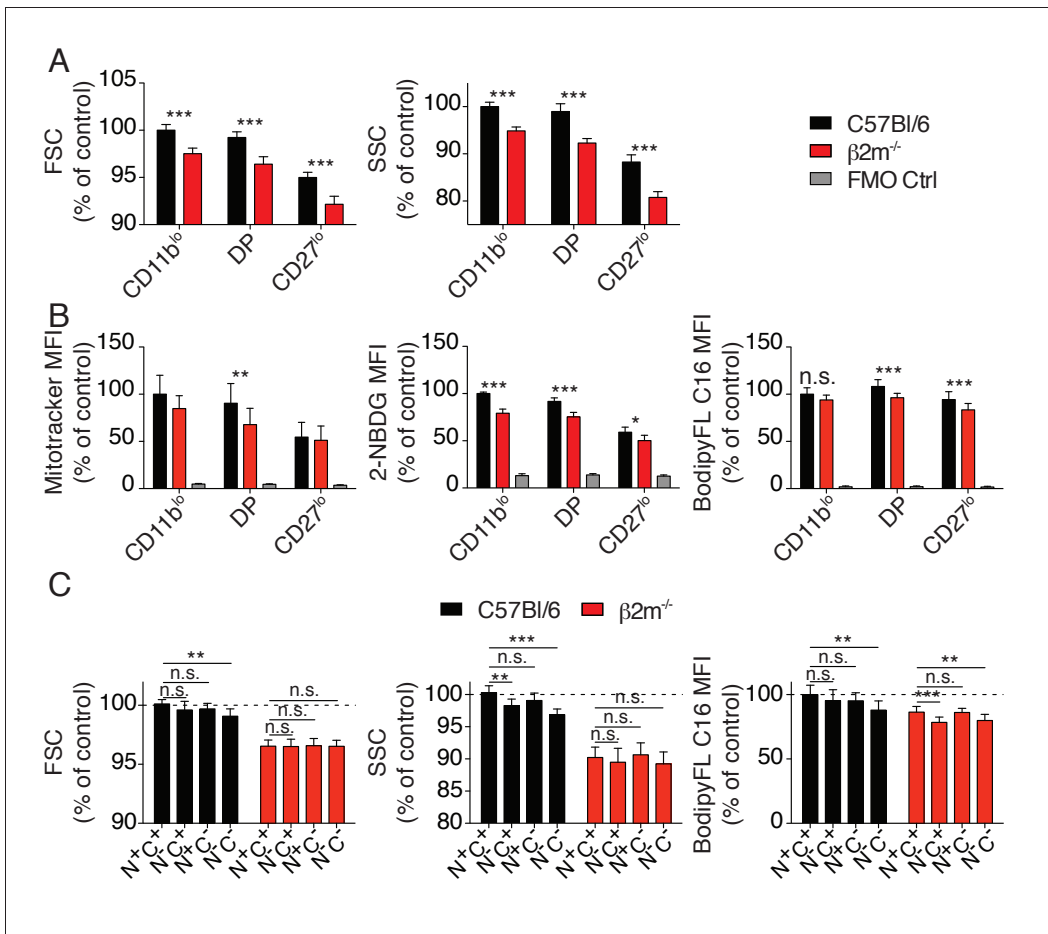
DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.26423.015>

FL-C16 were significantly higher (**Figure 6B**). In contrast, mitochondrial ROS production, lipid droplet content or lipid peroxidation were comparable in both cell types (data not shown). Differences were also detectable for FSC and SSC values as well as fatty-acid uptake when comparing reactive and hyporesponsive NK cell subsets present in the most mature  $\text{CD27}^{\text{low}}$  population of C57BL/6 mice (**Figure 6C**).

In summary, the higher activity of the Akt/mTOR pathway observed in reactive cells increased their metabolic activity compared to hyporesponsive NK cells, which may also contribute to their enhanced responsiveness.

### Cytokine stimulation overcomes NK cell education by inducing high mTOR activity that restores NK cell signaling

Several studies have demonstrated that hyporesponsive NK cells can be rendered reactive (**Ebihara et al., 2013; Elliott et al., 2010; Joncker et al., 2010; Sun and Lanier, 2008**). The underlying molecular mechanism has however remained elusive. We reasoned that if the mTOR pathway was really a key determinant of NK cell reactivity, acute activation of this pathway should immediately restore reactivity of hyporesponsive cells. To test this hypothesis, we stimulated NK cells from C57BL/6 or  $\text{B2m}^{-/-}$  mice with plate-bound antibodies stimulating NK1.1 or NKp46 and we simultaneously added IL-2, a cytokine known to potently activate mTOR (**Marçais et al., 2014**). To test the requirement for the mTOR pathway in this process, cells were also treated or not with Torin2. IL-2 resulted in an increase of the cell capacity to produce IFN- $\gamma$  and to degranulate as measured by CD107a exposure (**Figure 7A**). This acute treatment was sufficient for hyporesponsive cells to acquire a level of reactivity equal or even higher than that of reactive NK cells from C57BL/6, regardless of the stimulating antibody. mTOR activity was required for this effect since the increase in reactivity was suppressed by mTOR inhibition (**Figure 7A**). Similar results were obtained when using IL-

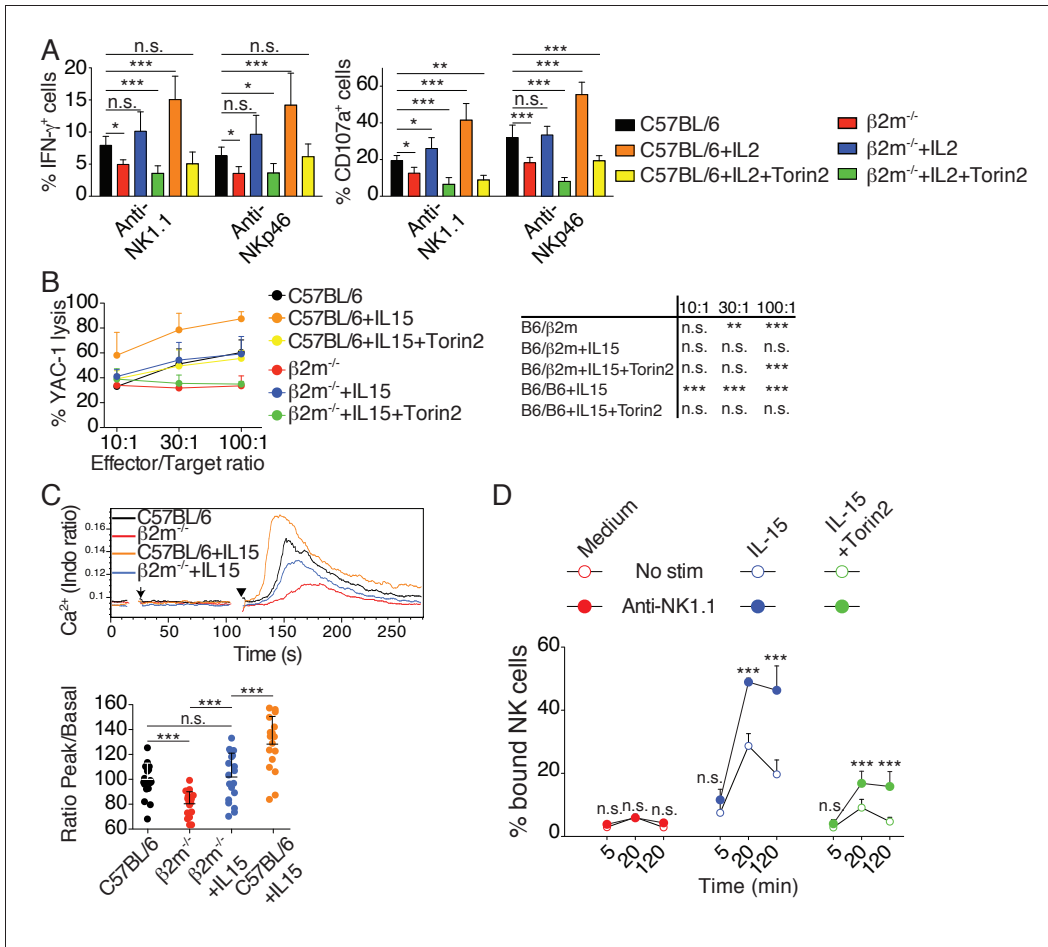


**Figure 6.** Metabolic parameters of reactive and hyporesponsive NK cells. (A) Bar graphs showing FSC and SSC values of splenic NK cell subsets from C57BL/6 or  $B2m^{-/-}$  mice (mean +SD,  $n = 6$  mice of each genotype in three independent experiments, t-test,  $***p < 0.001$ ). MFI were normalized to the CD11b<sup>lo</sup> subset of C57BL/6 mice. (B) Bar graphs showing MFI of mitotracker staining, 2-NBDG or BodipyFL C16 incorporation of splenic NK cell subsets from C57BL/6 or  $B2m^{-/-}$  mice (mean +SD,  $n = 6-10$  mice of each genotype in three independent experiments, t-test,  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$ , n.s. non significant). MFI were normalized to the CD11b<sup>lo</sup> subset of C57BL/6 mice. (C) Bar graphs showing FSC and SSC values or BodipyFL C16 incorporation of splenic NK cell subsets (gated on CD27<sup>low</sup>) from C57BL/6 or  $B2m^{-/-}$  mice (mean +SD,  $n = 6-10$  mice of each genotype in three independent experiments, t-test, n.s. non significant,  $*p < 0.05$ ,  $***p < 0.001$ ). MFI were normalized to the N<sup>+</sup>C<sup>+</sup> subset of C57BL/6 mice.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.26423.016>

15 instead of IL-2 (**Figure 7—figure supplement 1**). Acute IL-15 stimulation also restored the cytotoxic activity of hyporesponsive NK cells against YAC-1 cells while further enhancing cytotoxicity of C57BL/6 cells (**Figure 7B**). Again, this effect was completely reversed upon concomitant Torin2 treatment. Taken together, these results show that induction of responsiveness in NK cells upon cytokine exposure is a rapid phenomenon acting via mTOR activation.

In order to decipher the mechanism required for NK cell re-education, we next tested whether acute IL-15 treatment restored early signaling in hyporesponsive cells. We first investigated the impact of IL-15 treatment on the calcium flux triggered by NK1.1 stimulation in control or hyporesponsive NK cells. As expected, NK1.1 stimulation of hyporesponsive NK cells resulted in a very poor calcium flux compared to reactive NK cells (**Figure 7C**). Strikingly, treatment with IL-15 increased the calcium flux ability of reactive and hyporesponsive NK cells in an mTOR-dependent way (**Figure 7C** and **Figure 7—figure supplement 2**). We then measured the impact of IL-15 treatment on LFA-1 activation following NK1.1 stimulation. The presence of IL-15 in the assay rendered hyporesponsive NK cells able to activate LFA-1 upon NK1.1 stimulation and bind ICAM-1 coated beads (**Figure 7D**).



**Figure 7.** Cytokine stimulation overcomes NK cell education by inducing high mTOR activity that restores NKAR signaling. (A) Percentage (mean +SD) of IFN- $\gamma$  or CD107a positive cells among splenic NK cells from C57BL/6 or  $B2m^{-/-}$  mice following 4 hr stimulation with coated anti-NK1.1 or anti-NKp46 in the presence or absence of 200U/ml IL-2 and 250 nM Torin2 as indicated (n = 9–10 mice of each genotype in five independent experiments, one-way ANOVA comparing each condition to the C57BL/6 condition, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, n.s. non significant). (B) Percentage (mean +SD) of dead YAC-1 cells after a 4 hr co-culture with purified NK cells from C57BL/6 or  $B2m^{-/-}$  mice at the indicated Effector/Target ratio in the presence or absence of 10 ng/ml IL-15 and 250 nM Torin2 as indicated (n = 7 mice of each genotype in three independent experiments, the table on the right presents the results of a two-way ANOVA comparing C57BL/6 with the other experimental conditions for the indicated Effector/Target ratio, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 n.s. non significant). (C) *Top*: Representative histogram overlay showing the Ca<sup>2+</sup> flux intensity in splenic NK cells from C57BL/6 or  $B2m^{-/-}$  mice with or without IL-15 (100 ng/ml). NK cells were activated following incubation with biotinylated anti-NK1.1 (Arrow) followed by cross-linking with streptavidin (Arrowhead). *Down*: Bar graph showing the Ratio Peak/basal normalized to the ratio of control NK cells (mean +SD of n = 17–20 replicates from 6 mice in six independent experiments, one-way ANOVA comparing the indicated conditions, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001). (D) Percentage of splenic NK cells from  $B2m^{-/-}$  mice bound to beads coated with ICAM-1 after the indicated incubation time with or without NK1.1 stimulation, in the presence or absence of 100 ng/ml IL-15 and 250 nM Torin2 (n = 6 mice in four independent experiments, two-way ANOVA comparing stimulated to non-stimulated conditions, n.s. non significant, \*\*\*p<0.001).

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.26423.017>

The following figure supplements are available for figure 7:

**Figure supplement 1.** Percentage (mean +SD) of IFN- $\gamma$  or CD107a positive cells among splenic NK cells from C57BL/6 or  $B2m^{-/-}$  mice following 4 hr stimulation with coated anti-NK1.1 or anti-NKp46 in the presence or absence of 10 ng/ml IL-15 and 250 nM Torin2 as indicated (n = 4 mice of each genotype in two independent experiments, one-way ANOVA comparing each condition to the C57BL/6 condition, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, n.s. non significant).

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.26423.018>

**Figure supplement 2.** *Left*: Representative histogram overlay showing the Ca<sup>2+</sup> flux intensity in splenic NK cells from C57BL/6 or  $B2m^{-/-}$  mice with or without IL-15 (100 ng/ml) and Torin2 (500 nM).

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.26423.019>

This effect was strongly decreased upon Torin2 treatment, underlying the non-redundant role of mTOR in this process.

Altogether, these results show that acute stimulation of the mTOR pathway can restore the ability of hyporesponsive NK cells to induce calcium flux and activate LFA-1 upon NKAr engagement, thereby re-establishing their reactivity.

## Discussion

Here, to gain mechanistic insight into the phenomenon of NK cell education, we explored signal transduction pathways downstream NKAr in reactive and hyporesponsive NK cells. We found that the activity of the Akt/mTOR pathway was selectively higher in reactive NK cells. This was characterized by higher basal phosphorylation of direct and indirect targets of both mTOR complexes (mTORC1 and 2) in strict correlation with the reactivity level. In addition, this pattern was lost concomitantly with the loss of reactivity observed upon transfer of reactive cells in *B2m*<sup>-/-</sup> hosts. Our screen also revealed that two out of the three NFκB p65 phosphorylations investigated (S468 and S529) correlated with reactivity. This could be the result of the heightened Akt/mTOR pathway activity, as mTORC2 has been involved in NFκB activation during CD4 T cell stimulation (Lee et al., 2010). Alternatively, this could reveal the involvement of other pathways in the control of NK cell reactivity.

What is the extracellular signal and the signaling pathway responsible for the maintenance of mTOR basal activity in reactive NK cells specifically? An obvious candidate would be IL-15 as this cytokine is a privileged activator of this pathway (Marçais et al., 2014). However, pSTAT5 levels were identical between reactive and hyporesponsive NK cells (data not shown). Moreover, in vivo treatment with antibodies blocking IL-15 signaling did not alter NK cell education (data not shown). Finally, it is difficult to envisage how reactive cells would get preferential access to IL-15. Instead, in line with the disarming hypothesis, we would favor a model in which basal mTOR activity is set independently of education signals. This initial activity would then be decreased by disarming signals. How mTOR activity is decreased by chronic NKAr stimulation is still an open question. We hypothesize that in the absence of surrounding MHC-I or in NK cells lacking functional NKirs, unopposed NKAr signaling could lead to shut-down of the Akt/mTOR pathway due to depletion of necessary intermediates or establishment of negative feedbacks as it has been demonstrated in the case of induction of resistance to insulin (Um et al., 2006). Engagement of NKirs would prevent this desensitization and maintain an optimal activity of the pathway. In favor of this hypothesis, we show that SHP-1, the phosphatase triggered by NKir ligation and necessary to maintain NK cell reactivity (Viant et al., 2014), was required to maintain an optimal activity of the mTOR pathway. Furthermore, transfer of *Nur77*<sup>GFP</sup> cells into *B2m*<sup>-/-</sup> hosts was accompanied by an increase in the GFP level, evidence of active NKAr signaling, and followed by the loss of mTOR basal activity concomitant with the loss of reactivity of NKG2A<sup>+</sup>Ly49C<sup>+</sup> NK cells.

Previous studies have conclusively shown that NK cell education is not an on-off switch but rather a variation on a continuous axis (Brodin et al., 2009a; Joncker et al., 2009). We propose that the mTOR pathway is the long-sought molecular rheostat able to both respond to educating signals and control effector functions in return. Indeed, we showed that activity of the Akt/mTOR pathway is regulated commensurate with the level of NKir engagement by MHC-I molecules. Furthermore, we demonstrated that modulation of mTOR activity by exogenous cytokine or pharmacologic treatments was directly correlated with NK cell responsiveness. Furthermore, mTOR could also regulate NK cell responsiveness by integrating signals beyond NKir ligands. Considering the concept of the extended rheostat model as described initially by Höglund and colleagues (Brodin et al., 2009b), we envision extracellular inputs in an extended sense, including immunological as well as purely metabolic inputs. Interestingly, a number of environmental conditions, such as the presence of inflammatory (Sun and Lanier, 2008) or anti-inflammatory cytokines (Sungur et al., 2013), but also the presence of nutrients (Keppel et al., 2015), impact on NK cell responsiveness. All these stimuli positively or negatively affect mTOR activity (Efeyan et al., 2015; Marçais et al., 2014; Sinclair et al., 2013; Viel et al., 2016). mTOR activity could thus be the nexus targeted by these different stimuli which would explain their impact on NK cell responsiveness. Thus, considering mTOR as the rheostat of NK cell responsiveness would help to build a common conceptual framework in which these observations could be ordered.

Finally, we also present evidence on how mTOR activity affects NK cell effector functions. We demonstrated that mTOR activity controls two distinct events characterizing reactive NK cells and required for the triggering of effector functions:  $\text{Ca}^{2+}$  flux and integrin activation. How could mTOR activity control such apparently unrelated signaling events? Depending on the relative involvement of mTORC1 or mTORC2, several possibilities can be considered. First, the fact that Rapamycin which specifically inhibits mTORC1 is sufficient to decrease responsiveness unmasks the non-redundant role of this complex. In line with the role of mTORC1 in the control of cellular metabolism, we described that higher basal mTOR activity in educated cells translated into higher basal metabolism as measured by morphological parameters as well as glucose and fatty-acid uptake and mitochondrial content. We and others have described the necessary role of the mTORC1-dependent metabolism in the development of NK cell effector functions ([Donnelly et al., 2014](#); [Marçais et al., 2014](#)). In addition to improving the cellular fitness, metabolism could directly modulate signaling by controlling the availability of key intermediates as recently described for Th17/Treg differentiation ([Araujo et al., 2017](#)). Another possibility would be through the regulation of the actin cytoskeleton. Indeed, an emerging mode of lymphocyte signaling regulation is through cytoskeleton-dependent regulation of membrane receptors compartmentalization ([Mattila et al., 2016](#)), a process that has been proposed to explain the reactivity of educated NK cells ([Guia et al., 2011](#)). mTORC2 has been shown to regulate the cytoskeletal organization ([Huang et al., 2013](#); [Sarbasov et al., 2004](#)) and could therefore prime reactive NK cells by cytoskeletal modifications. An interesting parallel can also be drawn with T cell anergy. Indeed, TCR stimulation in the absence of CD28 co-stimulation results in T cell hyporesponsiveness to further re-stimulation. Numerous studies have shown that the precise control of mTOR activity is at the heart of this phenomenon ([Chappert and Schwartz, 2010](#); [Marçais et al., 2014](#); [Zheng et al., 2007](#); [2009](#)). Interestingly, this state is characterized by defective  $\text{Ca}^{2+}$  flux ([Dubois et al., 1998](#)). Further resembling hyporesponsive NK cells, treatment of anergic T cells with IL-2 restores their responsiveness, an event that relies on mTOR activation ([Dubois et al., 1998](#); [Zheng et al., 2007](#)).  $\text{Ca}^{2+}$  flux is classically triggered by  $\text{IP}_3$ -induced release of endoplasmic reticulum stores which, upon detection by the STIM1/2 sensors, leads to opening of the ORAI channels present on the plasma membrane and extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  entry ([Hogan and Rao, 2015](#)). In addition, an underestimated  $\text{Ca}^{2+}$  store is the endo-lysosomal compartment ([Morgan et al., 2011](#)), which constitutes a further link with mTOR since mTORC1 is activated on the lysosomal surface and positively regulated by lysosomal nutrients ([Efeyan et al., 2015](#)) as well as by calcium release from lysosomal stores ([Li et al., 2016](#)). Concerning regulation of integrin activation, a putative link would be through the inhibition of GSK3 $\beta$ . Indeed, this kinase is inhibited by Akt following mTORC2 activation ([Hagiwara et al., 2012](#)), and a recent study showed that its inhibition leads to better ability of NK cells to form conjugate via integrin activation ([Parameswaran et al., 2016](#)). In addition, PKC $\theta$ , a target of mTORC2 ([Lee et al., 2010](#)), activates WIP via S488 phosphorylation in lymphocytes ([Fried et al., 2014](#)). Since a macro-complex involving WIP, WASp, actin and myosin IIa has been defined in NK cells ([Krzewski et al., 2006](#)), WIP activation could explain better interaction with ICAM-1-coated beads in our assay and ultimately better docking to target cell.

In summary, these findings identify the activity of the mTOR pathway as the molecular rheostat responsible for the control of basal NK cell reactivity in response to NK cell ligation. In addition, this provides a molecular basis for a number of previous experiments showing that NK cell education can be overcome by cytokine treatment. Finally, our data underline the extreme versatility of the regulation of NK cell responsiveness and further point to mTOR as a valid target for the manipulation of NK cells for therapeutic purposes.

## Materials and methods

### Mice and adoptive transfers

Wild-type C57BL/6 mice were purchased from Charles River Laboratories (L'Arbresle).  $B2m^{-/-}$  ([Koller et al., 1990](#)),  $Ncr1^{iCre/+}$   $Mtor^{lox/lox}$  ([Marçais et al., 2014](#)) and  $Ncr1^{iCre/+}$   $Ptpn6^{lox/lox}$  mice ([Viant et al., 2014](#)) were previously described, littermate control mice were used as controls.  $Nur77^{GFP}$  mice were previously described ([Moran et al., 2011](#)). Female mice 8 to 24 week-old were used.  $Nur77^{GFP}$  splenocytes were injected i.v. in C57BL/6 or  $B2m^{-/-}$  host. Each host received  $25 \times 10^6$  splenocytes labeled with CTV (1  $\mu\text{M}$ , Molecular Probes) to allow subsequent identification. Host



mice were sacrificed one or 3 days after for analysis of the spleen. This study was carried out in accordance with the French recommendations in the Guide for the ethical evaluation of experiments using laboratory animals and the European guidelines 86/609/CEE. All experimental studies were approved by the bioethic local committee CECCAPP. Mice were bred in the Plateau de Biologie Expérimentale de la Souris, our animal facility.

### Flow cytometry

Single cell suspensions of spleens were obtained and stained. Intracellular stainings for phosphorylated proteins were done using Lyse/Fix and PermlII buffers (BD Bioscience). Measurement of glucose uptake was performed as described (Marçais *et al.*, 2014). Mitochondrial content was measured using Mitotracker Green (Molecular Probes, 1  $\mu$ M) incubated for 10 min at 37°C in PBS. Lipid uptake was measured using BodipyFL C16 (Molecular Probes, 1  $\mu$ M) incubated for 30 min at 37°C in complete medium. Surface staining were then performed to identify the different populations. Flow cytometry was carried out on a FACS LSR II or on a FACS Fortessa (Becton-Dickinson). Data were analysed using FlowJo (Treestar). The following mAbs from eBioscience, BD Biosciences or Biolegend were used: anti-CD19 (ebio1D3), anti-CD3 (145–2 C11), anti-NK1.1 (PK136), anti-NKp46 (29A1.4), anti-CD49b (DX5), anti-CD11b (M1/70), anti-CD27 (LG.7F9), anti-Ly49I (YL190), anti-NKG2A/C/E (20d5), anti-IFN- $\gamma$  (XMG1.2), anti-CD107a (1D4B). The mAb 4LO3311 recognizing Ly49C was purified on protein A column from supernatant of the 4LO3311 hybridoma generously provided by Pr. Suzanne Lemieux (Institut Armand Frappier, Québec). NKG2A positive cells were identified using the 20d5 clone which also recognizes NKG2C and NKG2E, however, since mouse resting NK cells only express NKG2A, we considered 20d5 reactive cells as NKG2A positive (Vance *et al.*, 1998).

### Cell culture and stimulation

$1.5 \times 10^6$  splenocytes were cultured on antibody coated plates (anti-NKp46 (Goat polyclonal, R&D), anti-NK1.1 (PK136, BioXCell) at 10  $\mu$ g/ml on Immulon 2HB or Nunclon plates) with Golgi-stop (BD Biosciences) in the presence of anti-CD107a for 4 hr. Cytokines and mTOR inhibitors were used at the following concentrations unless otherwise stated: rmlL-15 (Peprotech; 100 ng/ml), IL-2 (mull-2 supernatant; 200 U/ml), Rapamycin (Calbiochem; 25 nM), KU-0063794 (Stemgent; 3  $\mu$ M), AZD2014 (Selleckchem; 5  $\mu$ M) and Torin2 (Tocris; 250 nM). Surface and intracellular stainings were then performed and IFN- $\gamma$  production as well as CD107a exposure was measured by flow cytometry. In some experiments, cell viability was determined using 7AAD (Invitrogen, 250 nM).

For phospho-flow stainings following short-term NK1.1 stimulation,  $3 \times 10^6$  splenocytes were stimulated using biotinylated NK1.1 (PK136, 5  $\mu$ g/ml) followed 1 min 30 s later by streptavidin (Life Technologies, 10  $\mu$ g/ml) and fixed by addition of 10 volumes of Lyse/Fix at the indicated time point.

### In vivo cytotoxicity assay

Recipient mice were treated by daily i.p. injection of Torin2 (10 mg/kg, vehicle: 40% H<sub>2</sub>O, 40% PEG400 (Sigma), 20% N methyl two pyrrolidone (Sigma)) for 6 days prior to target transfer. Splenocytes from C57BL/6 or *B2m*<sup>-/-</sup> mice were labeled respectively with CellTraceViolet (1  $\mu$ M) or CFSE (5  $\mu$ M) (both from Life Technologies), and  $10 \times 10^6$  cells ( $5 \times 10^6$  of each genotype) were transferred by i.v. injection. 60 hr after transfer, splenocytes were isolated and analyzed by FACS. Percentage of remaining *B2m*<sup>-/-</sup> cells was calculated using the following formula: % remaining cells = 100 x (number *B2m*<sup>-/-</sup> cells/number C57BL/6 cells) at 60 h / (number *B2m*<sup>-/-</sup> cells/number C57BL/6 cells) in input mix.

### In vitro cytotoxicity assay

NK cells were first enriched by negative depletion prior to killing assay. Briefly, splenocytes suspension were incubated with biotinylated mAb against: CD3 (14–2 C11), TCR $\beta$  (H57-597), TCR $\gamma\delta$  (GL3), CD19 (ebio1D3), TER-119 (ter119) (eBioscience), followed by incubation with anti-biotin microbeads (Miltenyi), and enrichment by magnetic separation on an AutoMACS. Enriched NK cells were co-cultured for 4 hr with YAC-1 cells labeled with CFSE (Life Technologies) at different Effector to target (E/T) ratios calculated based on the cell number and the percentage of NK cells after purification.

The percentage of dead cells within CFSE positive YAC-1 cells was measured by flow cytometry after staining with 7AAD.

### Calcium flux

Calcium flux was measured essentially as described (Guia *et al.*, 2011). Briefly, RBC-lysed splenocytes suspension in RPMI/0.2% BSA/25 mM HEPES were stained at RT with the following mAb: anti-CD3/CD19 PEeFluor610, anti-CD49b APC, anti-CD11b APCCy7, anti-CD27 PE. They were then stained at  $1 \times 10^7$  cells/ml with Indo-1 (1  $\mu$ M, Life Technologies) for 30 min at 37°C and washed two times at 4°C. They were resuspended in the above medium and placed at 37°C for 30 min prior acquisition in the presence or absence of rmlL-15 (100 ng/ml) or Torin2 (250 nM). Samples were acquired on a LSRII (BD) as follow: 15 s baseline acquisition, addition of anti-NK1.1 biotin (PK136, 5  $\mu$ g/ml), acquisition for 1 min 30 s, addition of Streptavidin (Life Technologies, 10  $\mu$ g/ml) and, acquisition for another 3–5 min.

### ICAM1 coated beads assay

One mg Protein G-coated 4–4.9  $\mu$ m beads (Spherotec) was incubated for 30 min with 3.5  $\mu$ g ICAM1-hlgG1Fc (R&D) on a rotating wheel at RT in PBS. Beads were then pelleted by centrifugation and washed two times with complete medium, counted on a FACS Accuri (BD) and resuspended at  $1 \times 10^7$  beads/ml. In parallel, NK cells were purified (80–90% purity) using biotinylated antibodies directed against CD3, CD19, CD5, CD24, F4/80 and Ly6G and anti-biotin beads. They were then incubated with anti-NKp46-PE (29A1.4, BD) and purified anti-NK1.1 (PK136, BioXCell). 100,000 purified NK cells in 10  $\mu$ l were placed in a U-bottom well and 100,000 ICAM-1 coated beads were added. To cross-link NK1.1 and measure the effect of inside-out signaling, a Goat F(ab)<sub>2</sub> anti-mouse IgG (10  $\mu$ g/ml, Life Technologies) was added to the wells. Interaction was fixed at the indicated time-point by addition of 100  $\mu$ l Cytotfix/Cytoperm (BD). The percentage of interaction (i.e. percentage of NKp46 positive cells attached to beads) was measured by flow cytometry.

### Statistical analysis

Statistical analyses were performed using Prism 5 (Graph-Pad Software). Two tailed unpaired t-test, and ANOVA tests with Bonferroni correction were used as indicated in the figure legends. Significance is indicated as follows: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ . The heatmap presented in **Figure 1A** was established as follow: we first selected the phosphoepitopes for which the MFI (Mean Fluorescence Intensity) was significantly above the one of the FMO control (Student T-test). The MFI of the 15 selected phosphoepitopes for the 4 NC sub-populations defined in **Figure 1—figure supplement 2** was then normalized to the MFI value of the NKG2A<sup>+</sup>Ly49C<sup>+</sup> populations in the C57BL/6 mice and the values obtained were averaged to calculate the means for each populations. These values were used to establish the Heatmap using the Multiple Experiment Viewer application. We used the R statistical language to manage our database and carry out the statistical analysis (R version 3.3.2). We splitted the database into six datasets (2 Mouse strains \* Differentiation subsets), each containing the 15 phospho-epitopes. We performed an ANOVA for each phospho-epitope to test for the phosphorylation difference between the 4 NC sub-populations. The parameters of the ANOVA Type I SS were adapted to control for the experiment effect. The Bartlett Homogeneity of Variances Test was applied first, when it failed to reject its H<sub>0</sub>, then the phospho-epitope was retained for the ANOVA test. The normality of the residuals of the ANOVA model was checked graphically and numerically with the Shapiro-Wilk Normality Test. When this test failed to reject its H<sub>0</sub> then the adjusted P values for multiple comparisons were extracted with the Tukey's 'Honest Significant Difference' method.

### Acknowledgements

The authors acknowledge the contribution of SFR Biosciences (UMS3444/CNRS, ENSL, UCBL, US8/INSERM) facilities, in particular the Plateau de Biologie Expérimentale de la Souris, and the flow cytometry facility. We would like to thank Pr. Suzanne Lemieux (INRS, Institut Armand-Frappier, Laval, Québec, Canada) for providing us with the 4L03311 hybridoma and Pr. David Raulet for advice on its purification. We would like to thank Pr. Kristin Hogquist for the Nur77<sup>GFP</sup> mice. The TW lab is supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR JC SPHINKS to TW and ANR JC BaNK to AM), the ARC foundation (équipe labellisée), the European Research council (ERC-Stg



281025), and receives institutional grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Université Claude Bernard Lyon1 and ENS de Lyon. MM is the recipient of a fellowship from La Ligue Nationale contre le Cancer.

---

## Additional information

### Competing interests

Mathieu Bléry: MB is employee of Innate-Pharma. Eric Vivier: EV is shareholder of Innate-Pharma. The other authors declare that no competing interests exist.

### Funding

Funder	Grant reference number	Author
Agence Nationale de la Recherche	ANR-16-CE15-0005-01 Bank	Antoine Marçais
H2020 European Research Council	281025 Dironaki	Thierry Walzer

The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

### Author contributions

Antoine Marçais, Conceptualization, Formal analysis, Supervision, Funding acquisition, Validation, Investigation, Methodology, Writing—original draft, Writing—review and editing; Marie Marotel, Alice Koenig, Sébastien Viel, Formal analysis, Investigation, Writing—review and editing; Sophie Degouve, Formal analysis, Investigation, Methodology, Writing—review and editing; Sébastien Fauteux-Daniel, Annabelle Drouillard, Laurie Besson, Formal analysis, Investigation; Heinrich Schlums, Investigation, Methodology, Writing—review and editing; Omran Allatif, Formal analysis, Validation, Methodology; Mathieu Bléry, Eric Vivier, Resources, Writing—review and editing; Yenan Bryceson, Supervision, Validation, Writing—review and editing; Olivier Thauvat, Supervision, Validation, Methodology, Writing—review and editing; Thierry Walzer, Conceptualization, Supervision, Funding acquisition, Project administration, Writing—review and editing

### Author ORCIDs

Antoine Marçais, <https://orcid.org/0000-0002-3591-6268>

Thierry Walzer, <http://orcid.org/0000-0002-0857-8179>

### Ethics

Animal experimentation: This study was carried out in accordance with the French recommendations in the Guide for the ethical evaluation of experiments using laboratory animals and the European guidelines 86/609/CEE. All experimental studies were approved by the bioethic local committee CECCAPP (Permit number: CECCAPP\_ENS\_2014\_018).

### Decision letter and Author response

Decision letter <https://doi.org/10.7554/eLife.26423.021>

Author response <https://doi.org/10.7554/eLife.26423.022>

---

## Additional files

### Supplementary files

- Transparent reporting form

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.26423.020>

## References

- Anfossi N**, André P, Guida S, Falk CS, Roetynck S, Stewart CA, Bresó V, Frassati C, Reviron D, Middleton D, Romagné F, Ugolini S, Vivier E. 2006. Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity* **25**:331–342. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.06.013>, PMID: 16901727
- Araujo L**, Khim P, Mkhikian H, Mortales CL, Demetriou M. 2017. Glycolysis and glutaminolysis cooperatively control T cell function by limiting metabolite supply to N-glycosylation. *eLife* **6**:e21330. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.21330>, PMID: 28059703
- Brodin P**, Lakshmikanth T, Johansson S, Kärre K, Höglund P. 2009a. The strength of inhibitory input during education quantitatively tunes the functional responsiveness of individual natural killer cells. *Blood* **113**:2434–2441. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2008-05-156836>, PMID: 18974374
- Brodin P**, Kärre K, Höglund P. 2009b. NK cell education: not an on-off switch but a tunable rheostat. *Trends in Immunology* **30**:143–149. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.it.2009.01.006>, PMID: 19282243
- Chappert P**, Schwartz RH. 2010. Induction of T cell anergy: integration of environmental cues and infectious tolerance. *Current Opinion in Immunology* **22**:552–559. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.coi.2010.08.005>, PMID: 20869863
- Donnelly RP**, Loftus RM, Keating SE, Liou KT, Biron CA, Gardiner CM, Finlay DK. 2014. mTORC1-dependent metabolic reprogramming is a prerequisite for NK cell effector function. *The Journal of Immunology* **193**:4477–4484. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401558>, PMID: 25261477
- Dubois PM**, Pihlgren M, Tomkowiak M, Van Mechelen M, Marvel J. 1998. Tolerant CD8 T cells induced by multiple injections of peptide antigen show impaired TCR signaling and altered proliferative responses in vitro and in vivo. *Journal of Immunology* **161**:5260–5267. PMID: 9820498
- Ebihara T**, Jonsson AH, Yokoyama WM. 2013. Natural killer cell licensing in mice with inducible expression of MHC class I. *PNAS* **110**:E4232–E4237. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1318255110>, PMID: 24145414
- Efeyan A**, Comb WC, Sabatini DM. 2015. Nutrient-sensing mechanisms and pathways. *Nature* **517**:302–310. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature14190>, PMID: 25592535
- Elliott JM**, Wahle JA, Yokoyama WM. 2010. MHC class I-deficient natural killer cells acquire a licensed phenotype after transfer into an MHC class I-sufficient environment. *The Journal of Experimental Medicine* **207**:2073–2079. DOI: <https://doi.org/10.1084/jem.20100986>, PMID: 20819924
- Fernandez NC**, Treiner E, Vance RE, Jamieson AM, Lemieux S, Raulet DH. 2005. A subset of natural killer cells achieves self-tolerance without expressing inhibitory receptors specific for self-MHC molecules. *Blood* **105**:4416–4423. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2004-08-3156>, PMID: 15728129
- Fried S**, Reicher B, Pauker MH, Eliyahu S, Matalon O, Noy E, Chill J, Barda-Saad M. 2014. Triple-color FRET analysis reveals conformational changes in the WIP-WASp actin-regulating complex. *Science Signaling* **7**:ra60. DOI: <https://doi.org/10.1126/scisignal.2005198>, PMID: 24962707
- García-Martínez JM**, Moran J, Clarke RG, Gray A, Cosulich SC, Chresta CM, Alessi DR. 2009. Ku-0063794 is a specific inhibitor of the mammalian target of rapamycin (mTOR). *Biochemical Journal* **421**:29–42. DOI: <https://doi.org/10.1042/BJ20090489>, PMID: 19402821
- Guida S**, Jaeger BN, Piatek S, Mailfert S, Trombik T, Fenis A, Chevrier N, Walzer T, Kerdiles YM, Marguet D, Vivier E, Ugolini S. 2011. Confinement of activating receptors at the plasma membrane controls natural killer cell tolerance. *Science Signaling* **4**:ra21. DOI: <https://doi.org/10.1126/scisignal.2001608>, PMID: 21467299
- Guichard SM**, Curwen J, Bihani T, D’Cruz CM, Yates JW, Grondine M, Howard Z, Davies BR, Bigley G, Klinowska T, Pike KG, Pass M, Chresta CM, Polanska UM, McEwen R, Delpuech O, Green S, Cosulich SC. 2015. AZD2014, an inhibitor of mTORC1 and mTORC2, is highly effective in ER+ breast cancer when administered using intermittent or continuous schedules. *Molecular Cancer Therapeutics* **14**:2508–2518. DOI: <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-15-0365>, PMID: 26358751
- Hagiwara A**, Cornu M, Cybulski N, Polak P, Betz C, Trapani F, Terracciano L, Heim MH, Rüegg MA, Hall MN. 2012. Hepatic mTORC2 activates glycolysis and lipogenesis through Akt, glucokinase, and SREBP1c. *Cell Metabolism* **15**:725–738. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.03.015>, PMID: 22521878
- Hanke T**, Takizawa H, McMahon CW, Busch DH, Pamer EG, Miller JD, Altman JD, Liu Y, Cado D, Lemonnier FA, Bjorkman PJ, Raulet DH. 1999. Direct assessment of MHC class I binding by seven Ly49 inhibitory NK cell receptors. *Immunity* **11**:67–77. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80082-5](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80082-5), PMID: 10435580
- Hogan PG**, Rao A. 2015. Store-operated calcium entry: Mechanisms and modulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **460**:40–49. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.02.110>, PMID: 25998732
- Huang W**, Zhu PJ, Zhang S, Zhou H, Stoica L, Galiano M, Krnjević K, Roman G, Costa-Mattioli M. 2013. mTORC2 controls actin polymerization required for consolidation of long-term memory. *Nature Neuroscience* **16**:441–448. DOI: <https://doi.org/10.1038/nn.3351>, PMID: 23455608
- Höglund P**, Brodin P. 2010. Current perspectives of natural killer cell education by MHC class I molecules. *Nature Reviews Immunology* **10**:724–734. DOI: <https://doi.org/10.1038/nri2835>, PMID: 20818413
- Johansson MH**, Bieberich C, Jay G, Kärre K, Höglund P. 1997. Natural killer cell tolerance in mice with mosaic expression of major histocompatibility complex class I transgene. *The Journal of Experimental Medicine* **186**:353–364. DOI: <https://doi.org/10.1084/jem.186.3.353>, PMID: 9236187
- Johansson S**, Johansson M, Rosmaraki E, Vahlne G, Mehr R, Salmon-Divon M, Lemonnier F, Kärre K, Höglund P. 2005. Natural killer cell education in mice with single or multiple major histocompatibility complex class I

- molecules. *The Journal of Experimental Medicine* **201**:1145–1155. DOI: <https://doi.org/10.1084/jem.20050167>, PMID: 15809355
- Joncker NT**, Fernandez NC, Treiner E, Vivier E, Raulet DH. 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**:4572–4580. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803900>, PMID: 19342631
- Joncker NT**, Shifrin N, Delebecque F, Raulet DH. 2010. Mature natural killer cells reset their responsiveness when exposed to an altered MHC environment. *The Journal of Experimental Medicine* **207**:2065–2072. DOI: <https://doi.org/10.1084/jem.20100570>, PMID: 20819928
- Keppel MP**, Saucier N, Mah AY, Vogel TP, Cooper MA. 2015. Activation-specific metabolic requirements for NK Cell IFN- $\gamma$  production. *The Journal of Immunology* **194**:1954–1962. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402099>, PMID: 25595780
- Kim S**, Poursine-Laurent J, Truscott SM, Lybarger L, Song YJ, Yang L, French AR, Sunwoo JB, Lemieux S, Hansen TH, Yokoyama WM. 2005. Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature* **436**:709–713. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature03847>, PMID: 16079848
- Koller BH**, Marrack P, Kappler JW, Smithies O. 1990. Normal development of mice deficient in beta 2M, MHC class I proteins, and CD8+ T cells. *Science* **248**:1227–1230. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.2112266>, PMID: 2112266
- Krzewski K**, Chen X, Orange JS, Strominger JL. 2006. Formation of a WIP-, WASp-, actin-, and myosin IIA-containing multiprotein complex in activated NK cells and its alteration by KIR inhibitory signaling. *The Journal of Cell Biology* **173**:121–132. DOI: <https://doi.org/10.1083/jcb.200509076>, PMID: 16606694
- Lee K**, Gudapati P, Dragovic S, Spencer C, Joyce S, Killeen N, Magnuson MA, Boothby M. 2010. Mammalian target of rapamycin protein complex 2 regulates differentiation of Th1 and Th2 cell subsets via distinct signaling pathways. *Immunity* **32**:743–753. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.06.002>, PMID: 20620941
- Li RJ**, Xu J, Fu C, Zhang J, Zheng YG, Jia H, Liu JO. 2016. Regulation of mTORC1 by lysosomal calcium and calmodulin. *eLife* **5**:e19360. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.19360>, PMID: 27787197
- Liu Q**, Wang J, Kang SA, Thoreen CC, Hur W, Ahmed T, Sabatini DM, Gray NS. 2011. Discovery of 9-(6-aminopyridin-3-yl)-1-(3-(trifluoromethyl)phenyl)benzo[h][1,6]naphthyridin-2(1H)-one (Torin2) as a potent, selective, and orally available mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitor for treatment of cancer. *Journal of Medicinal Chemistry* **54**:1473–1480. DOI: <https://doi.org/10.1021/jm101520v>, PMID: 21322566
- Marçais A**, Blevins R, Graumann J, Feytout A, Dharmalingam G, Carroll T, Amado IF, Bruno L, Lee K, Walzer T, Mann M, Freitas AA, Boothby M, Fisher AG, Merkenschlager M. 2014. microRNA-mediated regulation of mTOR complex components facilitates discrimination between activation and anergy in CD4 T cells. *The Journal of Experimental Medicine* **211**:2281–2295. DOI: <https://doi.org/10.1084/jem.20132059>, PMID: 25311506
- Marçais A**, Cherfils-Vicini J, Viant C, Degouve S, Viel S, Fenis A, Rabilloud J, Mayol K, Tavares A, Biennu J, Gangloff YG, Gilson E, Vivier E, Walzer T. 2014. The metabolic checkpoint kinase mTOR is essential for IL-15 signaling during the development and activation of NK cells. *Nature Immunology* **15**:749–757. DOI: <https://doi.org/10.1038/ni.2936>, PMID: 24973821
- Mattila PK**, Batista FD, Treanor B. 2016. Dynamics of the actin cytoskeleton mediates receptor cross talk: An emerging concept in tuning receptor signaling. *The Journal of Cell Biology* **212**:267–280. DOI: <https://doi.org/10.1083/jcb.201504137>, PMID: 26833785
- Michaëlsson J**, Achour A, Salcedo M, Kåse-Sjöström A, Sundbäck J, Harris RA, Kärre K. 2000. Visualization of inhibitory Ly49 receptor specificity with soluble major histocompatibility complex class I tetramers. *European Journal of Immunology* **30**:300–307. DOI: [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200001\)30:1<300::AID-IMMU300>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200001)30:1<300::AID-IMMU300>3.0.CO;2-S), PMID: 10602053
- Moran AE**, Holzapfel KL, Xing Y, Cunningham NR, Maltzman JS, Punt J, Hogquist KA. 2011. T cell receptor signal strength in Treg and iNKT cell development demonstrated by a novel fluorescent reporter mouse. *The Journal of Experimental Medicine* **208**:1279–1289. DOI: <https://doi.org/10.1084/jem.20110308>, PMID: 21606508
- Morgan AJ**, Platt FM, Lloyd-Evans E, Galione A. 2011. Molecular mechanisms of endolysosomal Ca<sup>2+</sup> signalling in health and disease. *Biochemical Journal* **439**:349–378. DOI: <https://doi.org/10.1042/BJ20110949>, PMID: 21992097
- Oppenheim DE**, Roberts SJ, Clarke SL, Filler R, Lewis JM, Tigelaar RE, Girardi M, Hayday AC. 2005. Sustained localized expression of ligand for the activating NKG2D receptor impairs natural cytotoxicity in vivo and reduces tumor immunosurveillance. *Nature Immunology* **6**:928–937. DOI: <https://doi.org/10.1038/ni1239>, PMID: 16116470
- Parameswaran R**, Ramakrishnan P, Moreton SA, Xia Z, Hou Y, Lee DA, Gupta K, deLima M, Beck RC, Wald DN. 2016. Repression of GSK3 restores NK cell cytotoxicity in AML patients. *Nature Communications* **7**:11154. DOI: <https://doi.org/10.1038/ncomms11154>, PMID: 27040177
- Sabatini DM**, Erdjument-Bromage H, Lui M, Tempst P, Snyder SH. 1994. RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell* **78**:35–43. DOI: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90570-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90570-3), PMID: 7518356
- Sarbassov DD**, Ali SM, Kim DH, Guertin DA, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM. 2004. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Current Biology* **14**:1296–1302. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.06.054>, PMID: 15268862

- Sinclair LV**, Rolf J, Emslie E, Shi YB, Taylor PM, Cantrell DA. 2013. Control of amino-acid transport by antigen receptors coordinates the metabolic reprogramming essential for T cell differentiation. *Nature Immunology* **14**: 500–508. DOI: <https://doi.org/10.1038/ni.2556>, PMID: 23525088
- Spits H**, Artis D, Colonna M, Diefenbach A, Di Santo JP, Eberl G, Koyasu S, Locksley RM, McKenzie AN, Mebius RE, Powrie F, Vivier E. 2013. Innate lymphoid cells—a proposal for uniform nomenclature. *Nature Reviews Immunology* **13**:145–149. DOI: <https://doi.org/10.1038/nri3365>, PMID: 23348417
- Sun JC**, Lanier LL. 2008. Cutting edge: viral infection breaks NK cell tolerance to "missing self". *The Journal of Immunology* **181**:7453–7457. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.11.7453>, PMID: 19017932
- Sungur CM**, Tang-Feldman YJ, Ames E, Alvarez M, Chen M, Longo DL, Pomeroy C, Murphy WJ. 2013. Murine natural killer cell licensing and regulation by T regulatory cells in viral responses. *PNAS* **110**:7401–7406. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1218767110>, PMID: 23589894
- Thomas LM**, Peterson ME, Long EO. 2013. Cutting edge: NK cell licensing modulates adhesion to target cells. *The Journal of Immunology* **191**:3981–3985. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301159>, PMID: 24038086
- Tripathy SK**, Keyel PA, Yang L, Pingel JT, Cheng TP, Schneeberger A, Yokoyama WM. 2008. Continuous engagement of a self-specific activation receptor induces NK cell tolerance. *The Journal of Experimental Medicine* **205**:1829–1841. DOI: <https://doi.org/10.1084/jem.20072446>, PMID: 18606857
- Um SH**, D'Alessio D, Thomas G. 2006. Nutrient overload, insulin resistance, and ribosomal protein S6 kinase 1, S6K1. *Cell Metabolism* **3**:393–402. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.05.003>, PMID: 16753575
- Vance RE**, Kraft JR, Altman JD, Jensen PE, Raulet DH. 1998. Mouse CD94/NKG2A is a natural killer cell receptor for the nonclassical major histocompatibility complex (MHC) class I molecule Qa-1(b). *The Journal of Experimental Medicine* **188**:1841–1848. DOI: <https://doi.org/10.1084/jem.188.10.1841>, PMID: 9815261
- Viant C**, Fenis A, Chicanne G, Payrastre B, Ugolini S, Vivier E. 2014. SHP-1-mediated inhibitory signals promote responsiveness and anti-tumour functions of natural killer cells. *Nature Communications* **5**:5108. DOI: <https://doi.org/10.1038/ncomms6108>, PMID: 25355530
- Viel S**, Marçais A, Guimaraes FS, Loftus R, Rabilloud J, Grau M, Degouve S, Djebali S, Sanlaville A, Charrier E, Bienvenu J, Marie JC, Caux C, Marvel J, Town L, Huntington ND, Bartholin L, Finlay D, Smyth MJ, Walzer T. 2016. TGF- $\beta$  inhibits the activation and functions of NK cells by repressing the mTOR pathway. *Science Signaling* **9**:ra19. DOI: <https://doi.org/10.1126/scisignal.aad1884>, PMID: 26884601
- Vivier E**, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. 2008. Functions of natural killer cells. *Nature Immunology* **9**:503–510. DOI: <https://doi.org/10.1038/ni1582>, PMID: 18425107
- Wu MF**, Raulet DH. 1997. Class I-deficient hemopoietic cells and nonhemopoietic cells dominantly induce unresponsiveness of natural killer cells to class I-deficient bone marrow cell grafts. *Journal of Immunology* **158**: 1628–1633. PMID: 9029098
- Yang H**, Rudge DG, Koos JD, Vaidialingam B, Yang HJ, Pavletich NP. 2013. mTOR kinase structure, mechanism and regulation. *Nature* **497**:217–223. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature12122>, PMID: 23636326
- Zheng Y**, Collins SL, Lutz MA, Allen AN, Kole TP, Zarek PE, Powell JD. 2007. A role for mammalian target of rapamycin in regulating T cell activation versus anergy. *The Journal of Immunology* **178**:2163–2170. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.4.2163>, PMID: 17277121
- Zheng Y**, Delgoffe GM, Meyer CF, Chan W, Powell JD. 2009. Anergic T cells are metabolically anergic. *The Journal of Immunology* **183**:6095–6101. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803510>, PMID: 19841171
- Zimmer J**, Donato L, Hanau D, Cazenave JP, Tongio MM, Moretta A, de la Salle H, Salle Hdela. 1998. Activity and phenotype of natural killer cells in peptide transporter (TAP)-deficient patients (type I bare lymphocyte syndrome). *The Journal of Experimental Medicine* **187**:117–122. DOI: <https://doi.org/10.1084/jem.187.1.117>, PMID: 9419217

# BIBLIOGRAPHIE

- 1- Alfei, F., Kanev, K., Hofmann, M., Wu, M., Ghoneim, H.E., Roelli, P., Utschneider, D.T., Hösslin, M. von, Cullen, J.G., Fan, Y., et al. (2019). TOX reinforces the phenotype and longevity of exhausted T cells in chronic viral infection. *Nature* 1.
- 2- Algarra, I., García-Lora, A., Cabrera, T., Ruiz-Cabello, F., and Garrido, F. (2004). The selection of tumor variants with altered expression of classical and nonclassical MHC class I molecules: implications for tumor immune escape. *Cancer Immunol. Immunother.* CII 53, 904–910.
- 3- Alvarez, M., Simonetta, F., Baker, J., Pierini, A., Wenokur, A.S., Morrison, A.R., Murphy, W.J., and Negrin, R.S. (2019). Regulation of murine NK cell exhaustion through the activation of the DNA damage repair pathway. *JCI Insight*.
- 4- Anderson, A.C., Lord, G.M., Dardalhon, V., Lee, D.H., Sabatos-Peyton, C.A., Glimcher, L.H., and Kuchroo, V.K. (2010). T-bet, a Th1 transcription factor regulates the expression of Tim-3. *Eur. J. Immunol.* 40, 859–866.
- 5- Anderson, A.C., Joller, N., and Kuchroo, V.K. (2016). Lag-3, Tim-3, and TIGIT: Co-inhibitory Receptors with Specialized Functions in Immune Regulation. *Immunity* 44, 989–1004.
- 6- Andrade, F., Roy, S., Nicholson, D., Thornberry, N., Rosen, A., and Casciola-Rosen, L. (1998). Granzyme B directly and efficiently cleaves several downstream caspase substrates: implications for CTL-induced apoptosis. *Immunity* 8, 451–460.
- 7- André, P., Denis, C., Soulas, C., Bourbon-Caillet, C., Lopez, J., Arnoux, T., Bléry, M., Bonnafous, C., Gauthier, L., Morel, A., et al. (2018). Anti-NKG2A mAb Is a Checkpoint Inhibitor that Promotes Anti-tumor Immunity by Unleashing Both T and NK Cells. *Cell* 175, 1731-1743.e13.
- 8- Andzelm, M.M., Chen, X., Krzewski, K., Orange, J.S., and Strominger, J.L. (2007). Myosin IIA is required for cytolytic granule exocytosis in human NK cells. *J. Exp. Med.* 204, 2285–2291.
- 9- Anegón, I., Cuturi, M.C., Trinchieri, G., and Perussia, B. (1988). Interaction of Fc receptor (CD16) ligands induces transcription of interleukin 2 receptor (CD25) and lymphokine genes and expression of their products in human natural killer cells. *J. Exp. Med.* 167, 452–472.
- 10- Anfossi, N., André, P., Guia, S., Falk, C.S., Roetynck, S., Stewart, C.A., Breso, V., Frassati, C., Reviron, D., Middleton, D., et al. (2006). Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity* 25, 331–342.
- 11- Araki, K., Turner, A.P., Shaffer, V.O., Gangappa, S., Keller, S.A., Bachmann, M.F., Larsen, C.P., and Ahmed, R. (2009). mTOR regulates memory CD8 T-cell differentiation. *Nature* 460, 108–112.
- 12- Arase, H., Mocarski, E.S., Campbell, A.E., Hill, A.B., and Lanier, L.L. (2002). Direct recognition of cytomegalovirus by activating and inhibitory NK cell receptors. *Science* 296, 1323–1326.
- 13- Ardolino, M., Azimi, C.S., Iannello, A., Trevino, T.N., Horan, L., Zhang, L., Deng, W.,  
296



- Ring, A.M., Fischer, S., Garcia, K.C., et al. (2014). Cytokine therapy reverses NK cell anergy in MHC-deficient tumors. *J. Clin. Invest.* *124*, 4781–4794.
- 14- Arnon, T.I., Lev, M., Katz, G., Chernobrov, Y., Porgador, A., and Mandelboim, O. (2001). Recognition of viral hemagglutinins by NKp44 but not by NKp30. *Eur. J. Immunol.* *31*, 2680–2689.
- 15- Avery, L., Filderman, J., Szymczak-Workman, A.L., and Kane, L.P. (2018). Tim-3 co-stimulation promotes short-lived effector T cells, restricts memory precursors, and is dispensable for T cell exhaustion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *115*, 2455–2460.
- 16- Baitsch, L., Baumgaertner, P., Devèvre, E., Raghav, S.K., Legat, A., Barba, L., Wieckowski, S., Bouzourene, H., Deplancke, B., Romero, P., et al. (2011). Exhaustion of tumor-specific CD8<sup>+</sup> T cells in metastases from melanoma patients. *J. Clin. Invest.* *121*, 2350–2360.
- 17- Balaji, K.N., Schaschke, N., Machleidt, W., Catalfamo, M., and Henkart, P.A. (2002). Surface cathepsin B protects cytotoxic lymphocytes from self-destruction after degranulation. *J. Exp. Med.* *196*, 493–503.
- 18- Balsamo, M., Manzini, C., Pietra, G., Raggi, F., Blengio, F., Mingari, M.C., Varesio, L., Moretta, L., Bosco, M.C., and Vitale, M. (2013). Hypoxia downregulates the expression of activating receptors involved in NK-cell-mediated target cell killing without affecting ADCC. *Eur. J. Immunol.* *43*, 2756–2764.
- 19- Barber, D.L., Wherry, E.J., Masopust, D., Zhu, B., Allison, J.P., Sharpe, A.H., Freeman, G.J., and Ahmed, R. (2006). Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* *439*, 682–687.
- 20- Barlozzari, T., Reynolds, C.W., and Herberman, R.B. (1983). In vivo role of natural killer cells: involvement of large granular lymphocytes in the clearance of tumor cells in anti-asialo GM1-treated rats. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *131*, 1024–1027.
- 21- Barrow, A.D., and Trowsdale, J. (2008). The extended human leukocyte receptor complex: diverse ways of modulating immune responses. *Immunol. Rev.* *224*, 98–123.
- 22- Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Phillips, J.H., Lanier, L.L., and Spies, T. (1999). Activation of NK Cells and T Cells by NKG2D, a Receptor for Stress-Inducible MICA. *Science* *285*, 727–729.
- 23- Beaulieu, A.M., Zawislak, C.L., Nakayama, T., and Sun, J.C. (2014). The transcription factor Zbtb32 controls the proliferative burst of virus-specific natural killer cells responding to infection. *Nat. Immunol.* *15*, 546–553.
- 24- Becker, T.C., Wherry, E.J., Boone, D., Murali-Krishna, K., Antia, R., Ma, A., and Ahmed, R. (2002). Interleukin 15 Is Required for Proliferative Renewal of Virus-specific Memory CD8 T Cells. *J. Exp. Med.* *195*, 1541–1548.
- 25- Beldi-Ferchiou A, Caillat-Zucman S. Control of NK Cell Activation by Immune Checkpoint Molecules. *Int J Mol Sci.* 2017;18(10):2129. Published 2017 Oct 12. doi:10.3390/ijms18102129

- 26- Beldi-Ferchiou A, Lambert M, Dogniaux S, et al. PD-1 mediates functional exhaustion of activated NK cells in patients with Kaposi sarcoma. *Oncotarget*. 2016;7(45):72961–72977. doi:10.18632/oncotarget.12150
- 27- Bengsch, B., Johnson, A.L., Kurachi, M., Odorizzi, P.M., Pauken, K.E., Attanasio, J., Stelekati, E., McLane, L.M., Paley, M.A., Delgoffe, G.M., et al. (2016). Bioenergetic Insufficiencies Due to Metabolic Alterations Regulated by the Inhibitory Receptor PD-1 Are an Early Driver of CD8 + T Cell Exhaustion. *Immunity* 45, 358–373.
- 28- Bengsch, B., Ohtani, T., Khan, O., Setty, M., Manne, S., O'Brien, S., Gherardini, P.F., Herati, R.S., Huang, A.C., Chang, K.-M., et al. (2018). Epigenomic-Guided Mass Cytometry Profiling Reveals Disease-Specific Features of Exhausted CD8 T Cells. *Immunity* 48, 1029-1045.e5.
- 29- Benson, D.M., Bakan, C.E., Mishra, A., Hofmeister, C.C., Efebera, Y., Becknell, B., Baiocchi, R.A., Zhang, J., Yu, J., Smith, M.K., et al. (2010). The PD-1/PD-L1 axis modulates the natural killer cell versus multiple myeloma effect: a therapeutic target for CT-011, a novel monoclonal anti-PD-1 antibody. *Blood* 116, 2286–2294.
- 30- Besson, L., Charrier, E., Karlin, L., Allatif, O., Marçais, A., Rouzairre, P., Belmont, L., Attal, M., Lombard, C., Salles, G., et al. (2018). One-Year Follow-Up of Natural Killer Cell Activity in Multiple Myeloma Patients Treated With Adjuvant Lenalidomide Therapy. *Front. Immunol.* 9.
- 31- Bi, J., and Tian, Z. (2017). NK Cell Exhaustion. *Front. Immunol.* 8.
- 32- Billadeau, D.D., and Leibson, P.J. (2002). ITAMs versus ITIMs: striking a balance during cell regulation. *J. Clin. Invest.* 109, 161–168.
- 33- Binstadt, B.A., Billadeau, D.D., Jevremović, D., Williams, B.L., Fang, N., Yi, T., Koretzky, G.A., Abraham, R.T., and Leibson, P.J. (1998). SLP-76 is a direct substrate of SHP-1 recruited to killer cell inhibitory receptors. *J. Biol. Chem.* 273, 27518–27523.
- 34- Blackburn, S.D., Shin, H., Haining, W.N., Zou, T., Workman, C.J., Polley, A., Betts, M.R., Freeman, G.J., Vignali, D.A.A., and Wherry, E.J. (2009). Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat. Immunol.* 10, 29–37.
- 35- Boeijen, L.L., Hou, J., de Groen, R.A., Verbon, A., and Boonstra, A. (2019). Persistent Replication of HIV, Hepatitis C Virus (HCV), and HBV Results in Distinct Gene Expression Profiles by Human NK Cells. *J. Virol.* 93.
- 36- Borsellino, G., Kleinewietfeld, M., Di Mitri, D., Sternjak, A., Diamantini, A., Giometto, R., Höpner, S., Centonze, D., Bernardi, G., Dell'Acqua, M.L., et al. (2007). Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood* 110, 1225–1232.
- 37- Boshoff, C., and Weiss, R. (2002). AIDS-related malignancies. *Nat. Rev. Cancer* 2, 373–382.
- 38- Böttcher, J.P., Bonavita, E., Chakravarty, P., Blees, H., Cabeza-Cabrero, M., Sammiceli, S., Rogers, N.C., Sahai, E., Zelenay, S., and Reis e Sousa, C. (2018). NK Cells Stimulate Recruitment of cDC1 into the Tumor Microenvironment Promoting Cancer Immune

Control. *Cell* 172, 1022-1037.e14.

39- Bottino, C., Castriconi, R., Pende, D., Rivera, P., Nanni, M., Carnemolla, B., Cantoni, C., Grassi, J., Marcenaro, S., Reymond, N., et al. (2003a). Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule. *J. Exp. Med.* 198, 557–567.

40- Bottino, C., Castriconi, R., Pende, D., Rivera, P., Nanni, M., Carnemolla, B., Cantoni, C., Grassi, J., Marcenaro, S., Reymond, N., et al. (2003b). Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as Cell Surface Ligands for the Human DNAM-1 (CD226) Activating Molecule. *J. Exp. Med.* 198, 557.

41- Bozzano, F., Picciotto, A., Costa, P., Marras, F., Fazio, V., Hirsch, I., Olive, D., Moretta, L., and De Maria, A. (2011). Activating NK cell receptor expression/function (NKp30, NKp46, DNAM-1) during chronic viraemic HCV infection is associated with the outcome of combined treatment. *Eur. J. Immunol.* 41, 2905–2914.

42- Brandt, C.S., Baratin, M., Yi, E.C., Kennedy, J., Gao, Z., Fox, B., Haldeman, B., Ostrander, C.D., Kaifu, T., Chabannon, C., et al. (2009). The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans. *J. Exp. Med.* 206, 1495–1503.

43- Braud, V.M., Allan, D.S., O’Callaghan, C.A., Söderström, K., D’Andrea, A., Ogg, G.S., Lazetic, S., Young, N.T., Bell, J.I., Phillips, J.H., et al. (1998). HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 391, 795–799.

44- Brooks, D.G., McGavern, D.B., and Oldstone, M.B.A. (2006a). Reprogramming of antiviral T cells prevents inactivation and restores T cell activity during persistent viral infection. *J. Clin. Invest.* 116, 1675–1685.

45- Brooks, D.G., Trifilo, M.J., Edelmann, K.H., Teyton, L., McGavern, D.B., and Oldstone, M.B.A. (2006b). Interleukin-10 determines viral clearance or persistence in vivo. *Nat. Med.* 12, 1301–1309.

46- Bryceson, Y.T., March, M.E., Ljunggren, H.-G., and Long, E.O. (2006). Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood* 107, 159–166.

47- Buck, M.D., O’Sullivan, D., and Pearce, E.L. (2015). T cell metabolism drives immunity. *J. Exp. Med.* 212, 1345–1360.

48- Bucks, C.M., Norton, J.A., Boesteanu, A.C., Mueller, Y.M., and Katsikis, P.D. (2009). Chronic antigen stimulation alone is sufficient to drive CD8<sup>+</sup> T cell exhaustion. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 182, 6697–6708.

49- Bukowski, J.F., Woda, B.A., Habu, S., Okumura, K., and Welsh, R.M. (1983). Natural killer cell depletion enhances virus synthesis and virus-induced hepatitis in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 131, 1531–1538.

50- Burshtyn, D.N., Scharenberg, A.M., Wagtmann, N., Rajagopalan, S., Berrada, K., Yi, T., Kinet, J.P., and Long, E.O. (1996). Recruitment of tyrosine phosphatase HCP by the killer cell inhibitor receptor. *Immunity* 4, 77–85.



- 51- Butcher, S., Arney, K.L., and Cook, G.P. (1998). MAFA-L, an ITIM-containing receptor encoded by the human NK cell gene complex and expressed by basophils and NK cells. *Eur. J. Immunol.* **28**, 3755–3762.
- 52- Cantoni, C., Bottino, C., Vitale, M., Pessino, A., Augugliaro, R., Malaspina, A., Parolini, S., Moretta, L., Moretta, A., and Biassoni, R. (1999). NKp44, A Triggering Receptor Involved in Tumor Cell Lysis by Activated Human Natural Killer Cells, Is a Novel Member of the Immunoglobulin Superfamily. *J. Exp. Med.* **189**, 787–796.
- 53- Carpén, O., Virtanen, I., Lehto, V.P., and Saksela, E. (1983). Polarization of NK cell cytoskeleton upon conjugation with sensitive target cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **131**, 2695–2698.
- 54- Castillo, E.F., Stonier, S.W., Frasca, L., and Schluns, K.S. (2009). Dendritic Cells Support the In Vivo Development and Maintenance of NK Cells via IL-15 Trans-Presentation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **183**, 4948–4956.
- 55- Chan, C.J., Andrews, D.M., McLaughlin, N.M., Yagita, H., Gilfillan, S., Colonna, M., and Smyth, M.J. (2010). DNAM-1/CD155 interactions promote cytokine and NK cell-mediated suppression of poorly immunogenic melanoma metastases. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **184**, 902–911.
- 56- Chan, C.J., Martinet, L., Gilfillan, S., Souza-Fonseca-Guimaraes, F., Chow, M.T., Town, L., Ritchie, D.S., Colonna, M., Andrews, D.M., and Smyth, M.J. (2014). The receptors CD96 and CD226 oppose each other in the regulation of natural killer cell functions. *Nat. Immunol.* **15**, 431–438.
- 57- Chan, S.H., Kobayashi, M., Santoli, D., Perussia, B., and Trinchieri, G. (1992). Mechanisms of IFN-gamma induction by natural killer cell stimulatory factor (NKSF/IL-12). Role of transcription and mRNA stability in the synergistic interaction between NKSF and IL-2. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **148**, 92–98.
- 58- Chan CJ, Smyth MJ, Martinet L. Molecular mechanisms of natural killer cell activation in response to cellular stress. *Cell Death Differ.* 2014;21(1):5–14. doi:10.1038/cdd.2013.26
- 59- Chang C., Qiu J., O’Sullivan D., Buck MD, Noguchi T., Curtis JD., Chen Q., Gindin M., Gubin M., van der Windt GJW., Tonc E., Schreiber RD., Pearce EJ., Pearce E.L. Metabolic Competition in the Tumor Microenvironment Is a Driver of Cancer Progression. *Cell.* 2015 September 10; **162**(6): 1229–1241.
- 60- Chatila, T., Silverman, L., Miller, R., and Geha, R. (1989). Mechanisms of T cell activation by the calcium ionophore ionomycin. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **143**, 1283–1289.
- 61- Chen, J.H., Perry, C.J., Tsui, Y.-C., Staron, M.M., Parish, I.A., Dominguez, C.X., Rosenberg, D.W., and Kaech, S.M. (2015). Prostaglandin E2 and programmed cell death 1 signaling coordinately impair CTL function and survival during chronic viral infection. *Nat. Med.* **21**, 327–334.
- 62- Chen, S., Kawashima, H., Lowe, J.B., Lanier, L.L., and Fukuda, M. (2005). Suppression of tumor formation in lymph nodes by L-selectin-mediated natural killer cell recruitment. *J. Exp. Med.* **202**, 1679–1689.
- 63- Chen, X., Allan, D.S.J., Krzewski, K., Ge, B., Kopcow, H., and Strominger, J.L. (2006).

CD28-stimulated ERK2 phosphorylation is required for polarization of the microtubule organizing center and granules in YTS NK cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 10346–10351.

64- Chiavenna, S.M., Jaworski, J.P., and Vendrell, A. (2017). State of the art in anti-cancer mAbs. *J. Biomed. Sci.* *24*.

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

66- Chiossone, L., Dumas, P.-Y., Vienne, M., and Vivier, E. (2018). Natural killer cells and other innate lymphoid cells in cancer. *Nat. Rev. Immunol.* *18*, 671.

67- Clark, W.H., Elder, D.E., Guerry, D., Braitman, L.E., Trock, B.J., Schultz, D., Synnestvedt, M., and Halpern, A.C. (1989). Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. *J. Natl. Cancer Inst.* *81*, 1893–1904.

68- Clynes, R.A., Towers, T.L., Presta, L.G., and Ravetch, J.V. (2000). Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat. Med.* *6*, 443–446.

69- Coca, S., Perez-Piqueras, J., Martinez, D., Colmenarejo, A., Saez, M.A., Vallejo, C., Martos, J.A., and Moreno, M. (1997). The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma. *Cancer* *79*, 2320–2328.

70- Coles, S.J., Wang, E.C.Y., Man, S., Hills, R.K., Burnett, A.K., Tonks, A., and Darley, R.L. (2011). CD200 expression suppresses natural killer cell function and directly inhibits patient anti-tumor response in acute myeloid leukemia. *Leukemia* *25*, 792–799.

71- Cong, J., Wang, X., Zheng, X., Wang, D., Fu, B., Sun, R., Tian, Z., and Wei, H. (2018). Dysfunction of Natural Killer Cells by FBP1-Induced Inhibition of Glycolysis during Lung Cancer Progression. *Cell Metab.* *28*, 243-255.e5.

72- Conlon, K.C., Lugli, E., Welles, H.C., Rosenberg, S.A., Fojo, A.T., Morris, J.C., Fleisher, T.A., Dubois, S.P., Perera, L.P., Stewart, D.M., 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. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *33*, 74–82.

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

74- Cooper, M.A., Fehniger, T.A., Turner, S.C., Chen, K.S., Ghaheri, B.A., Ghayur, T., Carson, W.E., and Caligiuri, M.A. (2001b). Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood* *97*, 3146–3151.

75- Coudert, J.D., Scarpellino, L., Gros, F., Vivier, E., and Held, W. (2008). Sustained NKG2D engagement induces cross-tolerance of multiple distinct NK cell activation pathways. *Blood* *111*, 3571–3578.

76- Crawford, A., Angelosanto, J.M., Kao, C., Doering, T.A., Odorizzi, P.M., Barnett, B.E., and Wherry, E.J. (2014). Molecular and transcriptional basis of CD4+ T cell dysfunction during chronic infection. *Immunity* *40*, 289–302.

- 77- Crinier, A., Milpied, P., Escalière, B., Piperoglou, C., Galluso, J., Balsamo, A., Spinelli, L., Cervera-Marzal, I., Ebbo, M., Girard-Madoux, M., et al. (2018). High-Dimensional Single-Cell Analysis Identifies Organ-Specific Signatures and Conserved NK Cell Subsets in Humans and Mice. *Immunity* 49, 971-986.e5.
- 78- Croft, M. (2009). The role of TNF superfamily members in T-cell function and diseases. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 271–285.
- 79- Cursons, J., Guimaraes, F.S.-F., Foroutan, M., Anderson, A., Hollande, F., Hediye-Zadeh, S., Behren, A., Huntington, N.D., and Davis, M.J. (2019). A gene signature predicting natural killer cell infiltration and improved survival in melanoma patients. *Cancer Immunol. Res. canimm.0500.2018*.
- 80- Daniels, K.A., Devora, G., Lai, W.C., O'Donnell, C.L., Bennett, M., and Welsh, R.M. (2001). Murine cytomegalovirus is regulated by a discrete subset of natural killer cells reactive with monoclonal antibody to Ly49H. *J. Exp. Med.* 194, 29–44.
- 81- Daussy, C., Faure, F., Mayol, K., Viel, S., Gasteiger, G., Charrier, E., Bienvenu, J., Henry, T., Debien, E., Hasan, U.A., et al. (2014). T-bet and Eomes instruct the development of two distinct natural killer cell lineages in the liver and in the bone marrow. *J. Exp. Med.* 211, 563–577.
- 82- Degli-Esposti, M. (1999). To die or not to die—the quest of the TRAIL receptors. *J. Leukoc. Biol.* 65, 535–542.
- 83- Deguine, J., Breart, B., Lemaître, F., and Bousso, P. (2012). Cutting Edge: Tumor-Targeting Antibodies Enhance NKG2D-Mediated NK Cell Cytotoxicity by Stabilizing NK Cell–Tumor Cell Interactions. *J. Immunol.* 189, 5493–5497.
- 84- 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. (2016). CIS is a potent checkpoint in NK cell-mediated tumor immunity. *Nat. Immunol.* 17, 816–824.
- 85- Deligdisch, L., Jacobs, A.J., and Cohen, C.J. (1982). Histologic correlates of virulence in ovarian adenocarcinoma. II. Morphologic correlates of host response. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 144, 885–889.
- 86- Deng, W., Gowen, B.G., Zhang, L., Wang, L., Lau, S., Iannello, A., Xu, J., Rovis, T.L., Xiong, N., and Raulet, D.H. (2015). A shed NKG2D ligand that promotes natural killer cell activation and tumor rejection. *Science* 348, 136–139.
- 87- Dewan, M.Z., Terunuma, H., Ahmed, S., Ohba, K., Takada, M., Tanaka, Y., Toi, M., and Yamamoto, N. (2005). Natural killer cells in breast cancer cell growth and metastasis in SCID mice. *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* 59 Suppl 2, S375-379.
- 88- Di Santo, J.P. (2006). Natural killer cell developmental pathways: a question of balance. *Annu. Rev. Immunol.* 24, 257–286.
- 89- Diefenbach, A., Jensen, E.R., Jamieson, A.M., and Raulet, D.H. (2001). Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. *Nature* 413, 165–171.
- 90- Dighe, A.S., Richards, E., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (1994). Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma

receptors. *Immunity* 1, 447–456.

91- Doering, T.A., Crawford, A., Angelosanto, J.M., Paley, M.A., Ziegler, C.G., and Wherry, E.J. (2012). Network Analysis Reveals Centrally Connected Genes and Pathways Involved in CD8+ T Cell Exhaustion versus Memory. *Immunity* 37, 1130–1144.

92- Dokun, A.O., Kim, S., Smith, H.R., Kang, H.S., Chu, D.T., and Yokoyama, W.M. (2001). Specific and nonspecific NK cell activation during virus infection. *Nat. Immunol.* 2, 951–956.

93- Donnelly, R.P., Loftus, R.M., Keating, S.E., Liou, K.T., Biron, C.A., Gardiner, C.M., and Finlay, D.K. (2014). mTORC1-dependent metabolic reprogramming is a prerequisite for NK cell effector function. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 193, 4477–4484.

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

95- Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* 3, 991–998.

96- Ebbo, M., Gérard, L., Carpentier, S., Vély, F., Cypowyj, S., Farnarier, C., Vince, N., Malphettes, M., Fieschi, C., Oksenhendler, E., et al. (2016). Low Circulating Natural Killer Cell Counts are Associated With Severe Disease in Patients With Common Variable Immunodeficiency. *EBioMedicine* 6, 222–230.

97- Eckl, J., Buchner, A., Prinz, P.U., Riesenberger, R., Siegert, S.I., Kammerer, R., Nelson, P.J., and Noessner, E. (2012). Transcript signature predicts tissue NK cell content and defines renal cell carcinoma subgroups independent of TNM staging. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 90, 55–66.

98- Edwards, B.S., Nolla, H.A., and Hoffman, R.R. (1989). Relationship between target cell recognition and temporal fluctuations in intracellular Ca<sup>2+</sup> of human NK cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 143, 1058–1065.

99- Elliott, J.M., Wahle, J.A., and Yokoyama, W.M. (2010). MHC class I-deficient natural killer cells acquire a licensed phenotype after transfer into an MHC class I-sufficient environment. *J. Exp. Med.* 207, 2073–2079.

100- Engel, A.-M., Svane, I.M., Mouritsen, S., Rygaard, J., Clausen, J., and Werdelin, O. (1996). Methylcholanthrene-induced sarcomas in nude mice have short induction times and relatively low levels of surface MHC class I expression. *APMIS* 104, 629–639.

101- Epstein, N.A., and Fatti, L.P. (1976). Prostatic carcinoma: some morphological features affecting prognosis. *Cancer* 37, 2455–2465.

102- Faure-Dupuy, S., Lucifora, J., and Durantel, D. (2017). Interplay between the Hepatitis B Virus and Innate Immunity: From an Understanding to the Development of Therapeutic Concepts. *Viruses* 9.

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

- 104- Fauriat, C., Ivarsson, M.A., Ljunggren, H.-G., Malmberg, K.-J., and Michaelsson, J. (2010b). Education of human natural killer cells by activating killer cell immunoglobulin-like receptors. *Blood* *115*, 1166–1174.
- 105- Fehniger, T.A., Suzuki, K., Ponnappan, A., VanDeusen, J.B., Cooper, M.A., Florea, S.M., Freud, A.G., Robinson, M.L., Durbin, J., and Caligiuri, M.A. (2001). Fatal leukemia in interleukin 15 transgenic mice follows early expansions in natural killer and memory phenotype CD8<sup>+</sup> T cells. *J. Exp. Med.* *193*, 219–231.
- 106- Felices, M., Lenvik, T.R., Davis, Z.B., Miller, J.S., and Vallera, D.A. (2016). Generation of BiKEs and TriKEs to improve NK cell-mediated targeting of tumor cells. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *1441*, 333–346.
- 107- Felices, M., Lenvik, A.J., McElmurry, R., Chu, S., Hinderlie, P., Bendzick, L., Geller, M.A., Tolar, J., Blazar, B.R., and Miller, J.S. (2018). Continuous treatment with IL-15 exhausts human NK cells via a metabolic defect. *JCI Insight* *3*.
- 108- Fernandez, N.C., Lozier, A., Flament, C., Ricciardi-Castagnoli, P., Bellet, D., Suter, M., Perricaudet, M., Tursz, T., Maraskovsky, E., and Zitvogel, L. (1999). Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nat. Med.* *5*, 405–411.
- 109- Fernandez, N.C., Treiner, E., Vance, R.E., Jamieson, A.M., Lemieux, S., and Raulet, D.H. (2005). A subset of natural killer cells achieves self-tolerance without expressing inhibitory receptors specific for self-MHC molecules. *Blood* *105*, 4416–4423.
- 110- Feske, S. (2007). Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. *Nat. Rev. Immunol.* *7*, 690–702.
- 111- Finnberg, N., Klein-Szanto, A.J.P., and El-Deiry, W.S. (2008). TRAIL-R deficiency in mice promotes susceptibility to chronic inflammation and tumorigenesis. *J. Clin. Invest.* *118*, 111–123.
- 112- Firth, M.A., Madera, S., Beaulieu, A.M., Gasteiger, G., Castillo, E.F., Schluns, K.S., Kubo, M., Rothman, P.B., Vivier, E., and Sun, J.C. (2013). Nfil3-independent lineage maintenance and antiviral response of natural killer cells. *J. Exp. Med.* *210*, 2981–2990.
- 113- Fonseca, B.D., Smith, E.M., Yelle, N., Alain, T., Bushell, M., and Pause, A. (2014). The ever-evolving role of mTOR in translation. *Semin. Cell Dev. Biol.* *36*, 102–112.
- 114- Fourcade, J., Sun, Z., Benallaoua, M., Guillaume, P., Luescher, I.F., Sander, C., Kirkwood, J.M., Kuchroo, V., and Zarour, H.M. (2010). Upregulation of Tim-3 and PD-1 expression is associated with tumor antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cell dysfunction in melanoma patients. *J. Exp. Med.* *207*, 2175–2186.
- 115- Freud, A.G., and Caligiuri, M.A. (2006). Human natural killer cell development. *Immunol. Rev.* *214*, 56–72.
- 116- Frutoso, M., Morisseau, S., Tamzalit, F., Quéméner, A., Meghnem, D., Leray, I., Jacques, Y., and Mortier, E. (2018). Emergence of NK Cell Hyporesponsiveness after Two IL-15 Stimulation Cycles. *J. Immunol.* [jj1800086](https://doi.org/10.1093/immk/djz008).
- 117- Galluzzi, L., Buqué, A., Kepp, O., Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2017). Immunogenic

cell death in cancer and infectious disease. *Nat. Rev. Immunol.* 17, 97–111.

118- Galy, A., Travis, M., Cen, D., and Chen, B. (1995). Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. *Immunity* 3, 459–473.

119- Gao, Y., Souza-Fonseca-Guimaraes, F., Bald, T., Ng, S.S., Young, A., Ngiow, S.F., Rautela, J., Straube, J., Waddell, N., Blake, S.J., et al. (2017). Tumor immunoevasion by the conversion of effector NK cells into type 1 innate lymphoid cells. *Nat. Immunol.* 18, 1004–1015.

120- Garrido, F., and Algarra, I. (2001). MHC antigens and tumor escape from immune surveillance. *Adv. Cancer Res.* 83, 117–158.

121- Garrido, F., Ruiz-Cabello, F., Cabrera, T., Pérez-Villar, J.J., López-Botet, M., Duggan-Keen, M., and Stern, P.L. (1997). Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol. Today* 18, 89–95.

122- Garrido, F., Ruiz-Cabello, F., and Aptsiauri, N. (2017). Rejection versus escape: the tumor MHC dilemma. *Cancer Immunol. Immunother. CII* 66, 259–271.

123- Gasser, S., Orsulic, S., Brown, E.J., and Raulet, D.H. (2005). The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands for the NKG2D receptor. *Nature* 436, 1186–1190.

124- Gatti, R.A., and Good, R.A. (1971). Occurrence of malignancy in immunodeficiency diseases. A literature review. *Cancer* 28, 89–98.

125- Gauthier, L., Morel, A., Anceriz, N., Rossi, B., Blanchard-Alvarez, A., Grondin, G., Trichard, S., Cesari, C., Sapet, M., Bosco, F., et al. (2019). Multifunctional Natural Killer Cell Engagers Targeting NKp46 Trigger Protective Tumor Immunity. *Cell* 177, 1701-1713.e16.

126- Geiger, T.L., and Sun, J.C. (2016). Development and Maturation of Natural Killer Cells. *Curr. Opin. Immunol.* 39, 82–89.

127- Ghiringhelli, F., Ménard, C., Terme, M., Flament, C., Taieb, J., Chaput, N., Puig, P.E., Novault, S., Escudier, B., Vivier, E., et al. (2005). CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor- $\beta$ -dependent manner. *J. Exp. Med.* 202, 1075–1085.

128- Gilfillan, S., Chan, C.J., Cella, M., Haynes, N.M., Rapaport, A.S., Boles, K.S., Andrews, D.M., Smyth, M.J., and Colonna, M. (2008). DNAM-1 promotes activation of cytotoxic lymphocytes by nonprofessional antigen-presenting cells and tumors. *J. Exp. Med.* 205, 2965–2973.

129- Gill, S., Vasey, A.E., De Souza, A., Baker, J., Smith, A.T., Kohrt, H.E., Florek, M., Gibbs, K.D., Tate, K., Ritchie, D.S., et al. (2012). Rapid development of exhaustion and down-regulation of eomesodermin limit the antitumor activity of adoptively transferred murine natural killer cells. *Blood* 119, 5758–5768.

130- Glasner, A., Ghadially, H., Gur, C., Stanietzky, N., Tsukerman, P., Enk, J., and Mandelboim, O. (2012). Recognition and prevention of tumor metastasis by the NK receptor NKp46/NCR1. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 188, 2509–2515.



- 131- Glasner, A., Levi, A., Enk, J., Isaacson, B., Viukov, S., Orlanski, S., Scope, A., Neuman, T., Enk, C.D., Hanna, J.H., et al. (2018). NKp46 Receptor-Mediated Interferon- $\gamma$  Production by Natural Killer Cells Increases Fibronectin 1 to Alter Tumor Architecture and Control Metastasis. *Immunity* 48, 107-119.e4.
- 132- Gleason, M.K., Lenvik, T.R., McCullar, V., Felices, M., O'Brien, M.S., Cooley, S.A., Verneris, M.R., Cichocki, F., Holman, C.J., Panoskaltsis-Mortari, A., et al. (2012). Tim-3 is an inducible human natural killer cell receptor that enhances interferon gamma production in response to galectin-9. *Blood* 119, 3064–3072.
- 133- Goh, C., Narayanan, S., and Hahn, Y.S. (2013). Myeloid-derived suppressor cells: the dark knight or the joker in viral infections? *Immunol. Rev.* 255, 210–221.
- 134- Golden-Mason, L., Klarquist, J., Wahed, A.S., and Rosen, H.R. (2008). Cutting edge: programmed death-1 expression is increased on immunocytes in chronic hepatitis C virus and predicts failure of response to antiviral therapy: race-dependent differences. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 180, 3637–3641.
- 135- Gonçalves Silva, I., Yasinska, I.M., Sakhnevych, S.S., Fiedler, W., Wellbrock, J., Bardelli, M., Varani, L., Hussain, R., Siligardi, G., Ceccone, G., et al. (2017). The Tim-3-galectin-9 Secretory Pathway is Involved in the Immune Escape of Human Acute Myeloid Leukemia Cells. *EBioMedicine* 22, 44–57.
- 136- Gorelik, E., Rosen, B., Copeland, D., Weatherly, B., and Herberman, R.B. (1984). Evaluation of Role of Natural Killer Cells in Radiation-Induced Leukemogenesis in Mice. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 72, 1397–1403.
- 137- Gorelik, L., Constant, S., and Flavell, R.A. (2002). Mechanism of Transforming Growth Factor  $\beta$ -induced Inhibition of T Helper Type 1 Differentiation. *J. Exp. Med.* 195, 1499–1505.
- Graham, D.B., Cella, M., Giurisato, E., Fujikawa, K., Miletic, A.V., Kloepfel, T., Brim, K., Takai, T., Shaw, A.S., Colonna, M., et al. (2006). Vav1 controls DAP10-mediated natural cytotoxicity by regulating actin and microtubule dynamics. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 177, 2349–2355.
- 138- Grégoire, C., Chasson, L., Luci, C., Tomasello, E., Geissmann, F., Vivier, E., and Walzer, T. (2007). The trafficking of natural killer cells. *Immunol. Rev.* 220, 169–182.
- 139- Grégoire, C., Cognet, C., Chasson, L., Coupet, C.-A., Dalod, M., Reboldi, A., Marvel, J., Sallusto, F., Vivier, E., and Walzer, T. (2008). Intrasplenic trafficking of natural killer cells is redirected by chemokines upon inflammation. *Eur. J. Immunol.* 38, 2076–2084.
- 140- Guerra, N., Tan, Y.X., Joncker, N.T., Choy, A., Gallardo, F., Xiong, N., Knoblaugh, S., Cado, D., Greenberg, N.M., Greenberg, N.R., et al. (2008). NKG2D-deficient mice are defective in tumor surveillance in models of spontaneous malignancy. *Immunity* 28, 571–580.
- 141- Guia, S., Jaeger, B.N., Piatek, S., Mailfert, S., Trombik, T., Fenis, A., Chevrier, N., Walzer, T., Kerdiles, Y.M., Marguet, D., et al. (2011). Confinement of activating receptors at the plasma membrane controls natural killer cell tolerance. *Sci. Signal.* 4, ra21.
- 142- Guillerey, C., Andrade, L.F. de, Vuckovic, S., Miles, K., Ngiow, S.F., Yong, M.C.R., Teng, M.W.L., Colonna, M., Ritchie, D.S., Chesi, M., et al. (2015). Immunosurveillance and therapy of multiple myeloma are CD226 dependent.

- 143- Gumá, M., Budt, M., Sáez, A., Brckalo, T., Hengel, H., Angulo, A., and López-Botet, M. (2006). Expansion of CD94/NKG2C<sup>+</sup> NK cells in response to human cytomegalovirus-infected fibroblasts. *Blood* *107*, 3624–3631.
- 144- Guo, H., Samarakoon, A., Vanhaesebroeck, B., and Malarkannan, S. (2008). The p110 delta of PI3K plays a critical role in NK cell terminal maturation and cytokine/chemokine generation. *J. Exp. Med.* *205*, 2419–2435.
- 145- Gupta, P.K., Godec, J., Wolski, D., Adland, E., Yates, K., Pauken, K.E., Cosgrove, C., Ledderose, C., Junger, W.G., Robson, S.C., et al. (2015). CD39 Expression Identifies Terminally Exhausted CD8<sup>+</sup> T Cells. *PLoS Pathog.* *11*, e1005177.
- 146- Hackett, J., Tutt, M., Lipscomb, M., Bennett, M., Koo, G., and Kumar, V. (1986). Origin and differentiation of natural killer cells. II. Functional and morphologic studies of purified NK-1.1<sup>+</sup> cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *136*, 3124–3131.
- 147- Halfteck, G.G., Elboim, M., Gur, C., Achdout, H., Ghadially, H., and Mandelboim, O. (2009). Enhanced in vivo growth of lymphoma tumors in the absence of the NK-activating receptor NKp46/NCR1. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *182*, 2221–2230.
- 148- Haller, O., and Wigzell, H. (1977). Suppression of natural killer cell activity with radioactive strontium: effector cells are marrow dependent. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *118*, 1503–1506.
- 150- Heibein, J.A., Goping, I.S., Barry, M., Pinkoski, M.J., Shore, G.C., Green, D.R., and Bleackley, R.C. (2000). Granzyme B-Mediated Cytochrome C Release Is Regulated by the Bcl-2 Family Members Bid and Bax. *J. Exp. Med.* *192*, 1391–1402.
- 151- van Helden, M.J., Goossens, S., Daussy, C., Mathieu, A.-L., Faure, F., Marçais, A., Vandamme, N., Farla, N., Mayol, K., Viel, S., et al. (2015). Terminal NK cell maturation is controlled by concerted actions of T-bet and Zeb2 and is essential for melanoma rejection. *J. Exp. Med.* *212*, 2015–2025.
- 152- Herberman, R.B., Nunn, M.E., Holden, H.T., and Lavrin, D.H. (1975). Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells. *Int. J. Cancer* *16*, 230–239.
- 153- Heusel, J.W., Wesselschmidt, R.L., Shresta, S., Russell, J.H., and Ley, T.J. (1994). Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells. *Cell* *76*, 977–987.
- 154- Hilpert, J., Grosse-Hovest, L., Grünebach, F., Buechele, C., Nuebling, T., Raum, T., Steinle, A., and Salih, H.R. (2012). Comprehensive Analysis of NKG2D Ligand Expression and Release in Leukemia: Implications for NKG2D-Mediated NK Cell Responses. *J. Immunol.* *189*, 1360–1371.
- 155- Hodgins, J.J., Khan, S.T., Park, M.M., Auer, R.C., and Ardolino, M. (2019). Killers 2.0: NK cell therapies at the forefront of cancer control. *J. Clin. Invest.* *129*, 3499–3510.
- 156- Höglund, P., and Brodin, P. (2010). Current perspectives of natural killer cell education by MHC class I molecules. *Nat. Rev. Immunol.* *10*, 724–734.
- 157- Höglund, P., Ohlén, C., Carbone, E., Franksson, L., Ljunggren, H.G., Latour, A., Koller,



- B., and Kärre, K. (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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *88*, 10332–10336.
- 158- Horng, T., Bezbradica, J.S., and Medzhitov, R. (2007). NKG2D signaling is coupled to the interleukin 15 receptor signaling pathway. *Nat. Immunol.* *8*, 1345–1352.
- 159- Horowitz, A., Stegmann, K.A., and Riley, E.M. (2012). Activation of Natural Killer Cells during Microbial Infections. *Front. Immunol.* *2*.
- 160- Hoshino, T., Winkler-Pickett, R.T., Mason, A.T., Ortaldo, J.R., and Young, H.A. (1999). IL-13 Production by NK Cells: IL-13-Producing NK and T Cells Are Present In Vivo in the Absence of IFN- $\gamma$ . *J. Immunol.* *162*, 51–59.
- 161- Hsu, J., Hodgins, J.J., Marathe, M., Nicolai, C.J., Bourgeois-Daigneault, M.-C., Trevino, T.N., Azimi, C.S., Scheer, A.K., Randolph, H.E., Thompson, T.W., et al. (2018). Contribution of NK cells to immunotherapy mediated by PD-1/PD-L1 blockade. *J. Clin. Invest.* *128*, 4654–4668.
- 162- Huang, K., and Fingar, D.C. (2014). Growing knowledge of the mTOR signaling network. *Semin. Cell Dev. Biol.* *0*, 79–90.
- 163- Huber, S., Schramm, C., Lehr, H.A., Mann, A., Schmitt, S., Becker, C., Protschka, M., Galle, P.R., Neurath, M.F., and Blessing, M. (2004). Cutting Edge: TGF- $\beta$  Signaling Is Required for the In Vivo Expansion and Immunosuppressive Capacity of Regulatory CD4+CD25+ T Cells. *J. Immunol.* *173*, 6526–6531.
- 164- Hussain, S.P., Schwank, J., Staib, F., Wang, X.W., and Harris, C.C. (2007). TP53 mutations and hepatocellular carcinoma: insights into the etiology and pathogenesis of liver cancer. *Oncogene* *26*, 2166–2176.
- 165- Imai, K., Matsuyama, S., Miyake, S., Suga, K., and Nakachi, K. (2000). Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet Lond. Engl.* *356*, 1795–1799.
- 166- Ishigami, S., Natsugoe, S., Tokuda, K., Nakajo, A., Che, X., Iwashige, H., Aridome, K., Hokita, S., and Aikou, T. (2000). Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma. *Cancer* *88*, 577–583.
- 167- Jacobi, A.M., Rettig, G.R., Turk, R., Collingwood, M.A., Zeiner, S.A., Quadros, R.M., Harms, D.W., Bonthuis, P.J., Gregg, C., Ohtsuka, M., et al. (2017). Simplified CRISPR tools for efficient genome editing and streamlined protocols for their delivery into mammalian cells and mouse zygotes. *Methods San Diego Calif* *121–122*, 16–28.
- 168- Jacobs, R., Hintzen, G., Kemper, A., Beul, K., Kempf, S., Behrens, G., Sykora, K.W., and Schmidt, R.E. (2001). CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells. *Eur. J. Immunol.* *31*, 3121–3127.
- 169- Jamieson, A.M., Isnard, P., Dorfman, J.R., Coles, M.C., and Raulet, D.H. (2004). Turnover and Proliferation of NK Cells in Steady State and Lymphopenic Conditions. *J. Immunol.* *172*, 864–870.

- 170- Jass, J.R. (1986). Lymphocytic infiltration and survival in rectal cancer. *J. Clin. Pathol.* 39, 585–589.
- 171- Jiang, K., Zhong, B., Gilvary, D.L., Corliss, B.C., Hong-Geller, E., Wei, S., and Djeu, J.Y. (2000). Pivotal role of phosphoinositide-3 kinase in regulation of cytotoxicity in natural killer cells. *Nat. Immunol.* 1, 419–425.
- 172- Johansson, S., Johansson, M., Rosmaraki, E., Vahlne, G., Mehr, R., Salmon-Divon, M., Lemonnier, F., Kärre, K., and Höglund, P. (2005). Natural killer cell education in mice with single or multiple major histocompatibility complex class I molecules. *J. Exp. Med.* 201, 1145–1155.
- 173- Joller, N., Hafler, J.P., Brynedal, B., Kassam, N., Spoerl, S., Levin, S.D., Sharpe, A.H., and Kuchroo, V.K. (2011). TIGIT has T cell intrinsic inhibitory functions. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 186, 1338–1342.
- 174- Joncker, N.T., Shifrin, N., Delebecque, F., and Raulet, D.H. (2010). Mature natural killer cells reset their responsiveness when exposed to an altered MHC environment. *J. Exp. Med.* 207, 2065–2072.
- 175- Joyce, J.A., and Fearon, D.T. (2015). T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment. *Science* 348, 74–80.
- 176- Ju, Y., Hou, N., Meng, J., Wang, X., Zhang, X., Zhao, D., Liu, Y., Zhu, F., Zhang, L., Sun, W., et al. (2010). T cell immunoglobulin- and mucin-domain-containing molecule-3 (Tim-3) mediates natural killer cell suppression in chronic hepatitis B. *J. Hepatol.* 52, 322–329.
- 177- Kaplan, D.H., Shankaran, V., Dighe, A.S., Stockert, E., Aguet, M., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (1998). Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 7556–7561.
- 178- Karlhofer, F.M., Ribaldo, R.K., and Yokoyama, W.M. (1992). MHC class I alloantigen specificity of Ly-49+ IL-2-activated natural killer cells. *Nature* 358, 66–70.
- 179- Kärre, K., Ljunggren, H.G., Piontek, G., and Kiessling, R. (1986). Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 319, 675–678.
- 180- Kaufman, D.S., Schoon, R.A., Robertson, M.J., and Leibson, P.J. (1995). Inhibition of selective signaling events in natural killer cells recognizing major histocompatibility complex class I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 6484–6488.
- 181- Keir, M.E., Liang, S.C., Guleria, I., Latchman, Y.E., Qipo, A., Albacker, L.A., Koulmanda, M., Freeman, G.J., Sayegh, M.H., and Sharpe, A.H. (2006). Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *J. Exp. Med.* 203, 883–895.
- 182- Keppel, M.P., Saucier, N., Mah, A.Y., Vogel, T.P., and Cooper, M.A. (2015). Activation-specific metabolic requirements for NK Cell IFN- $\gamma$  production. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 194, 1954–1962.
- 183- Khakoo, S.I., Thio, C.L., Martin, M.P., Brooks, C.R., Gao, X., Astemborski, J., Cheng, J., Goedert, J.J., Vlahov, D., Hilgartner, M., et al. (2004). HLA and NK Cell Inhibitory Receptor Genes in Resolving Hepatitis C Virus Infection. *Science* 305, 872–874.

- 184- Khan, O., Giles, J.R., McDonald, S., Manne, S., Ngiow, S.F., Patel, K.P., Werner, M.T., Huang, A.C., Alexander, K.A., Wu, J.E., et al. (2019). TOX transcriptionally and epigenetically programs CD8+ T cell exhaustion. *Nature*.
- 185- Khaznadar, Z., Henry, G., Setterblad, N., Agaoglu, S., Raffoux, E., Boissel, N., Dombret, H., Toubert, A., and Dulphy, N. (2014). Acute myeloid leukemia impairs natural killer cells through the formation of a deficient cytotoxic immunological synapse. *Eur. J. Immunol.* **44**, 3068–3080.
- 186- Kiessling, R., Klein, E., and Wigzell, H. (1975a). “Natural” killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur. J. Immunol.* **5**, 112–117.
- 187- Kiessling, R., Klein, E., Pross, H., and Wigzell, H. (1975b). “Natural” killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Eur. J. Immunol.* **5**, 117–121.
- 188- Kim, J.E., Patel, M.A., Mangraviti, A., Kim, E.S., Theodoros, D., Velarde, E., Liu, A., Sankey, E.W., Tam, A., Xu, H., et al. (2017). Combination Therapy with Anti-PD-1, Anti-TIM-3, and Focal Radiation Results in Regression of Murine Gliomas. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **23**, 124–136.
- 189- Kim, N., Saudemont, A., Webb, L., Camps, M., Ruckle, T., Hirsch, E., Turner, M., and Colucci, F. (2007). The p110delta catalytic isoform of PI3K is a key player in NK-cell development and cytokine secretion. *Blood* **110**, 3202–3208.
- 190- Kim, S., Iizuka, K., Aguila, H.L., Weissman, I.L., and Yokoyama, W.M. (2000). In vivo natural killer cell activities revealed by natural killer cell-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 2731–2736.
- 191- Kim, S., Iizuka, K., Kang, H.-S.P., Dokun, A., French, A.R., Greco, S., and Yokoyama, W.M. (2002). In vivo developmental stages in murine natural killer cell maturation. *Nat. Immunol.* **3**, 523–528.
- 192- Kim, S., Poursine-Laurent, J., Truscott, S.M., Lybarger, L., Song, Y.-J., Yang, L., French, A.R., Sunwoo, J.B., Lemieux, S., Hansen, T.H., et al. (2005). Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature* **436**, 709–713.
- 193- Kobie, J.J., Shah, P.R., Yang, L., Rebhahn, J.A., Fowell, D.J., and Mosmann, T.R. (2006). T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **177**, 6780–6786.
- 194- Kondo, M., Weissman, I.L., and Akashi, K. (1997). Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* **91**, 661–672.
- 195- Krzywinska, E., Kantari-Mimoun, C., Kerdiles, Y., Sobocki, M., Isagawa, T., Gotthardt, D., Castells, M., Haubold, J., Millien, C., Viel, T., et al. (2017). Loss of HIF-1 $\alpha$  in natural killer cells inhibits tumour growth by stimulating non-productive angiogenesis. *Nat. Commun.* **8**, 1597.
- 196- Lakshmikanth, T., Burke, S., Ali, T.H., Kimpfler, S., Ursini, F., Ruggeri, L., Capanni, M., Umansky, V., Paschen, A., Sucker, A., et al. (2009). NCRs and DNAM-1 mediate NK cell

recognition and lysis of human and mouse melanoma cell lines in vitro and in vivo. *J. Clin. Invest.* *119*, 1251–1263.

197- Lampertico, P., Agarwal, K., Berg, T., Buti, M., Janssen, H.L.A., Papatheodoridis, G., Zoulim, F., and Tacke, F. (2017). EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.* *67*, 370–398.

198- Langdon, S., Hughes, A., Taylor, M.A., Kuczynski, E.A., Mele, D.A., Delpuech, O., Jarvis, L., Staniszewska, A., Cosulich, S., Carnevalli, L.S., et al. (2018). Combination of dual mTORC1/2 inhibition and immune-checkpoint blockade potentiates anti-tumour immunity. *Oncolmmunology* *7*, e1458810.

199- Lanier, L.L. (2005). NK cell recognition. *Annu. Rev. Immunol.* *23*, 225–274.

200- Lanier, L.L., Le, A.M., Civin, C.I., Loken, M.R., and Phillips, J.H. (1986). The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *136*, 4480–4486.

201- Lee, J., Su, E.W., Zhu, C., Hainline, S., Phuah, J., Moroco, J.A., Smithgall, T.E., Kuchroo, V.K., and Kane, L.P. (2011). Phosphotyrosine-dependent coupling of Tim-3 to T-cell receptor signaling pathways. *Mol. Cell. Biol.* *31*, 3963–3974.

202- Lee, S.-H., Zafer, A., de Repentigny, Y., Kothary, R., Tremblay, M.L., Gros, P., Duplay, P., Webb, J.R., and Vidal, S.M. (2003). Transgenic Expression of the Activating Natural Killer Receptor Ly49H Confers Resistance to Cytomegalovirus in Genetically Susceptible Mice. *J. Exp. Med.* *197*, 515–526.

203- Lee, W.Y., Hong, H.K., Ham, S.K., Kim, C.I., and Cho, Y.B. (2014). Comparison of colorectal cancer in differentially established liver metastasis models. *Anticancer Res.* *34*, 3321–3328.

204- Levin, S.D., Taft, D.W., Brandt, C.S., Bucher, C., Howard, E.D., Chadwick, E.M., Johnston, J., Hammond, A., Bontadelli, K., Ardourel, D., et al. (2011). Vstm3 is a member of the CD28 family and an important modulator of T-cell function. *Eur. J. Immunol.* *41*, 902–915.

205- Levitt, L.J., Nagler, A., Lee, F., Abrams, J., Shatsky, M., and Thompson, D. (1991). Production of granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor by human natural killer cells. Modulation by the p75 subunit of the interleukin 2 receptor and by the CD2 receptor. *J. Clin. Invest.* *88*, 67–75.

206- Li, F., Wei, H., Wei, H., Gao, Y., Xu, L., Yin, W., Sun, R., and Tian, Z. (2013). Blocking the natural killer cell inhibitory receptor NKG2A increases activity of human natural killer cells and clears hepatitis B virus infection in mice. *Gastroenterology* *144*, 392–401.

207- Li, H., Han, Y., Guo, Q., Zhang, M., and Cao, X. (2009a). Cancer-expanded myeloid-derived suppressor cells induce anergy of NK cells through membrane-bound TGF-beta 1. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *182*, 240–249.

208- Li, H., Zhai, N., Wang, Z., Song, H., Yang, Y., Cui, A., Li, T., Wang, G., Niu, J., Crispe, I.N., et al. (2018). Regulatory NK cells mediated between immunosuppressive monocytes and dysfunctional T cells in chronic HBV infection. *Gut* *67*, 2035–2044.

209- Li, M.O., Wan, Y.Y., Sanjabi, S., Robertson, A.-K.L., and Flavell, R.A. (2006).

TRANSFORMING GROWTH FACTOR- $\beta$  REGULATION OF IMMUNE RESPONSES. *Annu. Rev. Immunol.* *24*, 99–146.

210- Li, Y., Hofmann, M., Wang, Q., Teng, L., Chlewicki, L.K., Pircher, H., and Mariuzza, R.A. (2009b). Structure of natural killer cell receptor KLRG1 bound to E-cadherin reveals basis for MHC-independent missing self recognition. *Immunity* *31*, 35–46.

211- Lichtfuss, G.F., Cheng, W.-J., Farsakoglu, Y., Paukovics, G., Rajasuriar, R., Velayudham, P., Kramski, M., Hearps, A.C., Cameron, P.U., Lewin, S.R., et al. (2012). Virologically suppressed HIV patients show activation of NK cells and persistent innate immune activation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *189*, 1491–1499.

212- Linnemann, C., Heemskerk, B., Kvistborg, P., Kluijn, R.J.C., Bolotin, D.A., Chen, X., Bresser, K., Nieuwland, M., Schotte, R., Michels, S., et al. (2013). High-throughput identification of antigen-specific TCRs by TCR gene capture. *Nat. Med.* *19*, 1534–1541.

213- Lipponen, P.K., Eskelinen, M.J., Jauhainen, K., Harju, E., and Terho, R. (1992). Tumour infiltrating lymphocytes as an independent prognostic factor in transitional cell bladder cancer. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* *1990* *29A*, 69–75.

214- Liu, X., Wang, Y., Lu, H., Li, J., Yan, X., Xiao, M., Hao, J., Alekseev, A., Khong, H., Chen, T., et al. (2019). Genome-wide analysis identifies NR4A1 as a key mediator of T cell dysfunction. *Nature* *567*, 525–529.

215- Liu, Y., Cai, P., Wang, N., Zhang, Q., Chen, F., Shi, L., Zhang, Y., Wang, L., and Hu, L. (2017). Combined blockade of Tim-3 and MEK inhibitor enhances the efficacy against melanoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *484*, 378–384.

216- Ljunggren, H.G. (1985). Host resistance directed selectively against H-2-deficient lymphoma variants. Analysis of the mechanism. *J. Exp. Med.* *162*, 1745–1759.

217- Ljunggren, H.G., Ohlén, C., Höglund, P., Franksson, L., and Kärre, K. (1991). The RMA-S lymphoma mutant; consequences of a peptide loading defect on immunological recognition and graft rejection. *Int. J. Cancer Suppl. J. Int. Cancer Suppl.* *6*, 38–44.

218- Lodolce, J.P., Boone, D.L., Chai, S., Swain, R.E., Dassopoulos, T., Trettin, S., and Ma, A. (1998). IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. *Immunity* *9*, 669–676.

219- Long, E.O. (2008). Negative signaling by inhibitory receptors: the NK cell paradigm. *Immunol. Rev.* *224*, 70–84.

220- López-Soto, A., Huergo-Zapico, L., Galván, J.A., Rodrigo, L., Herreros, A.G. de, Astudillo, A., and Gonzalez, S. (2013). Epithelial–Mesenchymal Transition Induces an Antitumor Immune Response Mediated by NKG2D Receptor. *J. Immunol.* *190*, 4408–4419.

221- López-Soto, A., Gonzalez, S., Smyth, M.J., and Galluzzi, L. (2017). Control of Metastasis by NK Cells. *Cancer Cell* *32*, 135–154.

222- Lou, Z., Jevremovic, D., Billadeau, D.D., and Leibson, P.J. (2000). A balance between positive and negative signals in cytotoxic lymphocytes regulates the polarization of lipid rafts during the development of cell-mediated killing. *J. Exp. Med.* *191*, 347–354.



- 223- Lucas, M., Schachterle, W., Oberle, K., Aichele, P., and Diefenbach, A. (2007a). Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15. *Immunity* 26, 503–517.
- 224- Lucas, M., Schachterle, W., Oberle, K., Aichele, P., and Diefenbach, A. (2007b). Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15. *Immunity* 26, 503–517.
- 225- Mamessier, E., Sylvain, A., Thibult, M.-L., Houvenaeghel, G., Jacquemier, J., Castellano, R., Gonçalves, A., André, P., Romagné, F., Thibault, G., et al. (2011). Human breast cancer cells enhance self tolerance by promoting evasion from NK cell antitumor immunity. *J. Clin. Invest.* 121, 3609–3622.
- 226- Man, K., Gabriel, S.S., Liao, Y., Gloury, R., Preston, S., Henstridge, D.C., Pellegrini, M., Zehn, D., Berberich-Siebelt, F., Febbraio, M.A., et al. (2017). Transcription Factor IRF4 Promotes CD8+ T Cell Exhaustion and Limits the Development of Memory-like T Cells during Chronic Infection. *Immunity* 47, 1129-1141.e5.
- 227- Mandelboim, O., Lieberman, N., Lev, M., Paul, L., Arnon, T.I., Bushkin, Y., Davis, D.M., Strominger, J.L., Yewdell, J.W., and Porgador, A. (2001). Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. *Nature* 409, 1055–1060.
- 228- Marçais, A., Viel, S., Grau, M., Henry, T., Marvel, J., and Walzer, T. (2013). Regulation of Mouse NK Cell Development and Function by Cytokines. *Front. Immunol.* 4.
- 229- Marçais, A., Cherfils-Vicini, J., Viant, C., Degouve, S., Viel, S., Fenis, A., Rabilloud, J., Mayol, K., Tavares, A., Bienvenu, J., et al. (2014). The metabolic checkpoint kinase mTOR is essential for IL-15 signaling during the development and activation of NK cells. *Nat. Immunol.* 15, 749–757.
- 230- Marçais, A., Marotel, M., Degouve, S., Koenig, A., Fauteux-Daniel, S., Drouillard, A., Schlums, H., Viel, S., Besson, L., Allatif, O., et al. (2017). High mTOR activity is a hallmark of reactive natural killer cells and amplifies early signaling through activating receptors. *ELife* 6.
- 231- Marcus, A., Mao, A.J., Lensink-Vasan, M., Wang, L., Vance, R.E., and Raulet, D.H. (2018). Tumor-Derived cGAMP Triggers a STING-Mediated Interferon Response in Non-tumor Cells to Activate the NK Cell Response. *Immunity* 49, 754-763.e4.
- 232- Marincola, F.M., Shamamian, P., Simonis, T.B., Abati, A., Hackett, J., O’Dea, T., Fetsch, P., Yannelli, J., Restifo, N.P., and Mulé, J.J. (1994). Locus-specific analysis of human leukocyte antigen class I expression in melanoma cell lines. *J. Immunother. Emphas. Tumor Immunol. Off. J. Soc. Biol. Ther.* 16, 13–23.
- 233- Martin, M.P., Gao, X., Lee, J.-H., Nelson, G.W., Detels, R., Goedert, J.J., Buchbinder, S., Hoots, K., Vlahov, D., Trowsdale, J., et al. (2002). Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nat. Genet.* 31, 429–434.
- 234- Martincorena, I., Raine, K.M., Gerstung, M., Dawson, K.J., Haase, K., Van Loo, P., Davies, H., Stratton, M.R., and Campbell, P.J. (2017). Universal Patterns of Selection in Cancer and Somatic Tissues. *Cell* 171, 1029-1041.e21.
- 235- Martinet, J., Dufeu–Duchesne, T., Bruder Costa, J., Larrat, S., Marlu, A., Leroy, V., Plumas, J., and Aspor, C. (2012). Altered Functions of Plasmacytoid Dendritic Cells and

Reduced Cytolytic Activity of Natural Killer Cells in Patients With Chronic HBV Infection. *Gastroenterology* 143, 1586-1596.e8.

236- Martinet, L., Ferrari De Andrade, L., Guillerey, C., Lee, J.S., Liu, J., Souza-Fonseca-Guimaraes, F., Hutchinson, D.S., Kolesnik, T.B., Nicholson, S.E., Huntington, N.D., et al. (2015). DNAM-1 expression marks an alternative program of NK cell maturation. *Cell Rep.* 11, 85–97.

237- Martinez, G.J., Pereira, R.M., Äijö, T., Kim, E.Y., Marangoni, F., Pipkin, M.E., Togher, S., Heissmeyer, V., Zhang, Y.C., Crotty, S., et al. (2015). The transcription factor NFAT promotes exhaustion of activated CD8<sup>+</sup> T cells. *Immunity* 42, 265–278.

238- Masilamani, M., Nguyen, C., Kabat, J., Borrego, F., and Coligan, J.E. (2006). CD94/NKG2A inhibits NK cell activation by disrupting the actin network at the immunological synapse. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 177, 3590–3596.

239- Mavilio, D., Lombardo, G., Benjamin, J., Kim, D., Follman, D., Marcenaro, E., O’Shea, M.A., Kinter, A., Kovacs, C., Moretta, A., et al. (2005). Characterization of CD56–/CD16+ natural killer (NK) cells: A highly dysfunctional NK subset expanded in HIV-infected viremic individuals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 2886–2891.

240- Mayol, K., Biajoux, V., Marvel, J., Balabanian, K., and Walzer, T. (2011). Sequential desensitization of CXCR4 and S1P5 controls natural killer cell trafficking. *Blood* 118, 4863–4871.

241- McGranahan, N., Rosenthal, R., Hiley, C.T., Rowan, A.J., Watkins, T.B.K., Wilson, G.A., Birkbak, N.J., Veeriah, S., Van Loo, P., Herrero, J., et al. (2017). Allele-Specific HLA Loss and Immune Escape in Lung Cancer Evolution. *Cell* 171, 1259-1271.e11.

242- McLane, L.M., Abdel-Hakeem, M.S., and Wherry, E.J. (2019). CD8 T Cell Exhaustion During Chronic Viral Infection and Cancer. *Annu. Rev. Immunol.* 37, 457–495.

243- Mehrotra, P.T., Donnelly, R.P., Wong, S., Kanegane, H., Geremew, A., Mostowski, H.S., Furuke, K., Siegel, J.P., and Bloom, E.T. (1998). Production of IL-10 by Human Natural Killer Cells Stimulated with IL-2 and/or IL-12. *J. Immunol.* 160, 2637–2644.

244- Ménager, M.M., Ménasché, G., Romao, M., Knapnougel, P., Ho, C.-H., Garfa, M., Raposo, G., Feldmann, J., Fischer, A., and de Saint Basile, G. (2007). Secretory cytotoxic granule maturation and exocytosis require the effector protein hMunc13-4. *Nat. Immunol.* 8, 257–267.

245- Merino, A.M., Zhang, B., Dougherty, P.R., Luo, X., Wang, J., Blazar, B.R., Miller, J.S., and Cichocki, F. (2019). Chronic stimulation drives human NK cell dysfunction and epigenetic reprogramming. *J. Clin. Invest.* 130.

246- 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. (2014). *S. Cancer Res.* 74, 81–92.

247- Miller, B.C., Sen, D.R., Al Aboosy, R., Bi, K., Virkud, Y.V., LaFleur, M.W., Yates, K.B., Lako, A., Felt, K., Naik, G.S., et al. (2019). Subsets of exhausted CD8<sup>+</sup> T cells differentially mediate tumor control and respond to checkpoint blockade. *Nat. Immunol.* 20, 326–336.

- 248- Miller, J.S., Verfaillie, C., and McGlave, P. (1992). The generation of human natural killer cells from CD34+/DR- primitive progenitors in long-term bone marrow culture. *Blood* *80*, 2182–2187.
- 249- Moir, S., Ho, J., Malaspina, A., Wang, W., DiPoto, A.C., O’Shea, M.A., Roby, G., Kottlil, S., Arthos, J., Proschan, M.A., et al. (2008). Evidence for HIV-associated B cell exhaustion in a dysfunctional memory B cell compartment in HIV-infected viremic individuals. *J. Exp. Med.* *205*, 1797–1805.
- 250- Molgora, M., Bonavita, E., Ponzetta, A., Riva, F., Barbagallo, M., Jaillon, S., Popović, B., Bernardini, G., Magrini, E., Gianni, F., et al. (2017). IL-1R8 is a checkpoint in NK cells regulating anti-tumour and anti-viral activity. *Nature* *551*, 110–114.
- 251- Moretta, A., Bottino, C., Vitale, M., Pende, D., Cantoni, C., Mingari, M.C., Biassoni, R., and Moretta, L. (2001a). Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu. Rev. Immunol.* *19*, 197–223.
- 252- Moretta, A., Bottino, C., Vitale, M., Pende, D., Cantoni, C., Mingari, M.C., Biassoni, R., and Moretta, L. (2001b). Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu. Rev. Immunol.* *19*, 197–223.
- 253- Mortier, E., Woo, T., Advincula, R., Gozalo, S., and Ma, A. (2008). IL-15/Ralpha chaperones IL-15 to stable dendritic cell membrane complexes that activate NK cells via trans presentation. *J. Exp. Med.* *205*, 1213–1225.
- 254- Mueller, S.N., and Ahmed, R. (2009). High antigen levels are the cause of T cell exhaustion during chronic viral infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 8623–8628.
- 255- Munder, M., Choi, B.-S., Rogers, M., and Kropf, P. (2009). L-arginine deprivation impairs Leishmania major-specific T-cell responses. *Eur. J. Immunol.* *39*, 2161–2172.
- 256- Mundy-Bosse, B., Denlinger, N., McLaughlin, E., Chakravarti, N., Hwang, S., Chen, L., Mao, H.C., Kline, D., Youssef, Y., Kohnken, R., et al. (2018). Highly cytotoxic natural killer cells are associated with poor prognosis in patients with cutaneous T-cell lymphoma. *Blood Adv.* *2*, 1818–1827.
- 257- Nabekura, T., Kanaya, M., Shibuya, A., Fu, G., Gascoigne, N.R.J., and Lanier, L.L. (2014). Costimulatory molecule DNAM-1 is essential for optimal differentiation of memory natural killer cells during mouse cytomegalovirus infection. *Immunity* *40*, 225–234.
- 258- Naito, Y., Saito, K., Shiiba, K., Ohuchi, A., Saigenji, K., Nagura, H., and Ohtani, H. (1998). CD8+ T Cells Infiltrated within Cancer Cell Nests as a Prognostic Factor in Human Colorectal Cancer. *Cancer Res.* *58*, 3491–3494.
- 259- Ndhlovu, L.C., Lopez-Vergès, S., Barbour, J.D., Jones, R.B., Jha, A.R., Long, B.R., Schoeffler, E.C., Fujita, T., Nixon, D.F., and Lanier, L.L. (2012). Tim-3 marks human natural killer cell maturation and suppresses cell-mediated cytotoxicity. *Blood* *119*, 3734–3743.
- 260- Ni, J., Miller, M., Stojanovic, A., Garbi, N., and Cerwenka, A. (2012). Sustained effector function of IL-12/15/18-preactivated NK cells against established tumors. *J. Exp. Med.* *209*, 2351–2365.
- 261- Nicholson, J.M., and Cimini, D. (2013). Cancer Karyotypes: Survival of the Fittest.



262- Nimmerjahn, F., and Ravetch, J.V. (2008). Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 34–47.

263- Norell, H., Carlsten, M., Ohlum, T., Malmberg, K.-J., Masucci, G., Schedvins, K., Altermann, W., Handke, D., Atkins, D., Seliger, B., et al. (2006). Frequent Loss of HLA-A2 Expression in Metastasizing Ovarian Carcinomas Associated with Genomic Haplotype Loss and HLA-A2-Restricted HER-2/neu-Specific Immunity. *Cancer Res.* 66, 6387–6394.

264- Norris, S., Coleman, A., Kuri-Cervantes, L., Bower, M., Nelson, M., and Goodier, M.R. (2012). PD-1 expression on natural killer cells and CD8(+) T cells during chronic HIV-1 infection. *Viral Immunol.* 25, 329–332.

265- Odorizzi, P.M., Pauken, K.E., Paley, M.A., Sharpe, A., and Wherry, E.J. (2015). Genetic absence of PD-1 promotes accumulation of terminally differentiated exhausted CD8+ T cells. *J. Exp. Med.* 212, 1125–1137.

266- Ohs, I., Ducimetière, L., Marinho, J., Kulig, P., Becher, B., and Tugues, S. (2017). Restoration of Natural Killer Cell Antimetastatic Activity by IL12 and Checkpoint Blockade. *Cancer Res.* 77, 7059–7071.

267- O’Leary, J.G., Goodarzi, M., Drayton, D.L., and von Andrian, U.H. (2006). T cell- and B cell-independent adaptive immunity mediated by natural killer cells. *Nat. Immunol.* 7, 507–516.

268- Oliviero, B., Varchetta, S., Paudice, E., Michelone, G., Zaramella, M., Mavilio, D., De Filippi, F., Bruno, S., and Mondelli, M.U. (2009). Natural killer cell functional dichotomy in chronic hepatitis B and chronic hepatitis C virus infections. *Gastroenterology* 137, 1151–1160, 1160.e1-7.

269- Orange, J.S. (2008). Formation and function of the lytic NK-cell immunological synapse. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 713–725.

270- Orange, J.S., Ramesh, N., Remold-O’Donnell, E., Sasahara, Y., Koopman, L., Byrne, M., Bonilla, F.A., Rosen, F.S., Geha, R.S., and Strominger, J.L. (2002). Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for NK cell cytotoxicity and colocalizes with actin to NK cell-activating immunologic synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 11351–11356.

271- O’Sullivan, T., Saddawi-Konefka, R., Vermi, W., Koebel, C.M., Arthur, C., White, J.M., Uppaluri, R., Andrews, D.M., Ngiow, S.F., Teng, M.W.L., et al. (2012). Cancer immunoediting by the innate immune system in the absence of adaptive immunity. *J. Exp. Med.* 209, 1869–1882.

272- O’Sullivan, T.E., Johnson, L.R., Kang, H.H., and Sun, J.C. (2015a). BNIP3- and BNIP3L-Mediated Mitophagy Promotes the Generation of Natural Killer Cell Memory. *Immunity* 43, 331–342.

273- O’Sullivan, T.E., Sun, J.C., and Lanier, L.L. (2015b). Natural Killer Cell Memory. *Immunity* 43, 634–645.

274- Paley, M.A., Kroy, D.C., Odorizzi, P.M., Johnnidis, J.B., Dolfi, D.V., Barnett, B.E., Bikoff, E.K., Robertson, E.J., Lauer, G.M., Reiner, S.L., et al. (2012). Progenitor and terminal

subsets of CD8+ T cells cooperate to contain chronic viral infection. *Science* 338, 1220–1225.

275- Palma, L., Di Lorenzo, N., and Guidetti, B. (1978). Lymphocytic infiltrates in primary glioblastomas and recidivous gliomas. Incidence, fate, and relevance to prognosis in 228 operated cases. *J. Neurosurg.* 49, 854–861.

276- Park, H.S., Cho, U., Im, S.Y., Yoo, C.Y., Jung, J.H., Suh, Y.J., and Choi, H.J. (2019). Loss of Human Leukocyte Antigen Class I Expression Is Associated with Poor Prognosis in Patients with Advanced Breast Cancer. *J. Pathol. Transl. Med.* 53, 75–85.

277- Patsoukis, N., Bardhan, K., Chatterjee, P., Sari, D., Liu, B., Bell, L.N., Karoly, E.D., Freeman, G.J., Petkova, V., Seth, P., et al. (2015). PD-1 alters T-cell metabolic reprogramming by inhibiting glycolysis and promoting lipolysis and fatty acid oxidation. *Nat. Commun.* 6, 6692.

278- Pauken, K.E., and Wherry, E.J. (2015). Overcoming T cell exhaustion in infection and cancer. *Trends Immunol.* 36, 265–276.

279- Paul, S., Kulkarni, N., Shilpi, null, and Lal, G. (2016). Intratumoral natural killer cells show reduced effector and cytolytic properties and control the differentiation of effector Th1 cells. *Oncoimmunology* 5, e1235106.

280- Pavlovich, S.S., Lovett, S.P., Koroleva, G., Guito, J.C., Arnold, C.E., Nagle, E.R., Kulcsar, K., Lee, A., Thibaud-Nissen, F., Hume, A.J., et al. (2018). The Egyptian Roussette Genome Reveals Unexpected Features of Bat Antiviral Immunity. *Cell* 173, 1098-1110.e18.

281- Pearce, E.L., and Pearce, E.J. (2013). Metabolic Pathways In Immune Cell Activation And Quiescence. *Immunity* 38, 633–643.

282- Pehlivan, K.C., Duncan, B.B., and Lee, D.W. (2018). CAR-T Cell Therapy for Acute Lymphoblastic Leukemia: Transforming the Treatment of Relapsed and Refractory Disease. *Curr. Hematol. Malig. Rep.* 13, 396–406.

283- Pekarek, L.A., Starr, B.A., Toledano, A.Y., and Schreiber, H. (1995). Inhibition of tumor growth by elimination of granulocytes. *J. Exp. Med.* 181, 435–440.

284- Pende, D., Parolini, S., Pessino, A., Sivori, S., Augugliaro, R., Morelli, L., Marcenaro, E., Accame, L., Malaspina, A., Biassoni, R., et al. (1999). Identification and Molecular Characterization of Nkp30, a Novel Triggering Receptor Involved in Natural Cytotoxicity Mediated by Human Natural Killer Cells. *J. Exp. Med.* 190, 1505–1516.

285- Peng, L.-S., Zhang, J.-Y., Teng, Y.-S., Zhao, Y.-L., Wang, T.-T., Mao, F.-Y., Lv, Y.-P., Cheng, P., Li, W.-H., Chen, N., et al. (2017). Tumor-Associated Monocytes/Macrophages Impair NK-Cell Function via TGFβ1 in Human Gastric Cancer. *Cancer Immunol. Res.* 5, 248–256.

286- Peng, Y.-P., Zhu, Y., Zhang, J.-J., Xu, Z.-K., Qian, Z.-Y., Dai, C.-C., Jiang, K.-R., Wu, J.-L., Gao, W.-T., Li, Q., et al. (2013). Comprehensive analysis of the percentage of surface receptors and cytotoxic granules positive natural killer cells in patients with pancreatic cancer, gastric cancer, and colorectal cancer. *J. Transl. Med.* 11, 262.

287- Peppas, D., Micco, L., Javaid, A., Kennedy, P.T.F., Schurich, A., Dunn, C., Pallant, C.,

- Ellis, G., Khanna, P., Dusheiko, G., et al. (2010). Blockade of immunosuppressive cytokines restores NK cell antiviral function in chronic hepatitis B virus infection. *PLoS Pathog.* 6, e1001227.
- 288- Perrot, I., Michaud, H.-A., Giraudon-Paoli, M., Augier, S., Docquier, A., Gros, L., Courtois, R., Déjou, C., Jecko, D., Becquart, O., et al. (2019). Blocking Antibodies Targeting the CD39/CD73 Immunosuppressive Pathway Unleash Immune Responses in Combination Cancer Therapies. *Cell Rep.* 27, 2411-2425.e9.
- 289- Perussia, B. (1996). The Cytokine Profile of Resting and Activated NK Cells. *Methods San Diego Calif* 9, 370–378.
- 290- Perussia, B., Trinchieri, G., Jackson, A., Warner, N.L., Faust, J., Rumpold, H., Kraft, D., and Lanier, L.L. (1984). The Fc receptor for IgG on human natural killer cells: phenotypic, functional, and comparative studies with monoclonal antibodies. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 133, 180–189.
- 291- Petersen, J.L., Morris, C.R., and Solheim, J.C. (2003). Virus Evasion of MHC Class I Molecule Presentation. *J. Immunol.* 171, 4473–4478.
- 292- Philip, M., Fairchild, L., Sun, L., Horste, E.L., Camara, S., Shakiba, M., Scott, A.C., Viale, A., Lauer, P., Merghoub, T., et al. (2017). Chromatin states define tumour-specific T cell dysfunction and reprogramming. *Nature* 545, 452–456.
- 293- 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. (2011). Profound coordinated alterations of intratumoral NK cell phenotype and function in lung carcinoma. *Cancer Res.* 71, 5412–5422.
- 294- Plummer, M., de Martel, C., Vignat, J., Ferlay, J., Bray, F., and Franceschi, S. (2016). Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *Lancet Glob. Health* 4, e609-616.
- 295- Powell, J.D., Pollizzi, K.N., Heikamp, E.B., and Horton, M.R. (2012). Regulation of Immune Responses by mTOR. *Annu. Rev. Immunol.* 30, 39–68.
- 296- Prager, I., Liesche, C., Ooijen, H. van, Urlaub, D., Verron, Q., Sandström, N., Fasbender, F., Claus, M., Eils, R., Beaudouin, J., et al. (2019). NK cells switch from granzyme B to death receptor-mediated cytotoxicity during serial killing. *J. Exp. Med.* 216, 2113–2127.
- 297- Puccetti, P., and Grohmann, U. (2007). IDO and regulatory T cells: a role for reverse signalling and non-canonical NF-kappaB activation. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 817–823.
- 298- Ramoni, C., Luciani, F., Spadaro, F., Lugini, L., Lozupone, F., and Fais, S. (2002). Differential expression and distribution of ezrin, radixin and moesin in human natural killer cells. *Eur. J. Immunol.* 32, 3059–3065.
- 299- Rangachari, M., Zhu, C., Sakuishi, K., Xiao, S., Karman, J., Chen, A., Angin, M., Wakeham, A., Greenfield, E.A., Sobel, R.A., et al. (2012). Bat3 promotes T cell responses and autoimmunity by repressing Tim-3-mediated cell death and exhaustion. *Nat. Med.* 18, 1394–1400.

- 300- Rathmell, J.C., Heiden, M.G.V., Harris, M.H., Frauwirth, K.A., and Thompson, C.B. (2000). In the Absence of Extrinsic Signals, Nutrient Utilization by Lymphocytes Is Insufficient to Maintain Either Cell Size or Viability. *Mol. Cell* 6, 683–692.
- 301- Raulet, D.H., and Guerra, N. (2009). Oncogenic stress sensed by the immune system: role of natural killer cell receptors. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 568–580.
- 302- Raulet, D.H., and Vance, R.E. (2006). Self-tolerance of natural killer cells. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 520–531.
- 303- Redza-Dutordoir, M., and Averill-Bates, D.A. (2016). Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1863, 2977–2992.
- 304- Restifo, N.P., Smyth, M.J., and Snyder, A. (2016). Acquired resistance to immunotherapy and future challenges. *Nat. Rev. Cancer* 16, 121–126.
- 305- Reynders, A., Yessaad, N., Vu Manh, T.-P., Dalod, M., Fenis, A., Aubry, C., Nikitas, G., Escalière, B., Renaud, J.C., Dussurget, O., et al. (2011). Identity, regulation and in vivo function of gut NKp46+ROR $\gamma$ t+ and NKp46+ROR $\gamma$ t- lymphoid cells. *EMBO J.* 30, 2934–2947.
- 306- Ribas, A., Dummer, R., Puzanov, I., VanderWalde, A., Andtbacka, R.H.I., Michielin, O., Olszanski, A.J., Malvehy, J., Cebon, J., Fernandez, E., et al. (2017). Oncolytic Virotherapy Promotes Intratumoral T Cell Infiltration and Improves Anti-PD-1 Immunotherapy. *Cell* 170, 1109-1119.e10.
- 307- Riccardi, C., Santoni, A., Barlozzari, T., Puccetti, P., and Herberman, R.B. (1980). In vivo natural reactivity of mice against tumor cells. *Int. J. Cancer* 25, 475–486.
- 308- Richards, J.O., Chang, X., Blaser, B.W., Caligiuri, M.A., Zheng, P., and Liu, Y. (2006). Tumor growth impedes natural-killer-cell maturation in the bone marrow. *Blood* 108, 246–252.
- 309- Rilke, F., Colnaghi, M.I., Cascinelli, N., Andreola, S., Baldini, M.T., Bufalino, R., Della Porta, G., Ménard, S., Pierotti, M.A., and Testori, A. (1991). Prognostic significance of HER-2/neu expression in breast cancer and its relationship to other prognostic factors. *Int. J. Cancer* 49, 44–49.
- 310- Robinson, D., Shibuya, K., Mui, A., Zonin, F., Murphy, E., Sana, T., Hartley, S.B., Menon, S., Kastelein, R., Bazan, F., et al. (1997). IGIF does not drive Th1 development but synergizes with IL-12 for interferon-gamma production and activates IRAK and NFkappaB. *Immunity* 7, 571–581.
- 311- Robson, N.C., Wei, H., McAlpine, T., Kirkpatrick, N., Cebon, J., and Maraskovsky, E. (2009). Activin-A attenuates several human natural killer cell functions. *Blood* 113, 3218–3225.
- 312- Rocca, Y.S., Roberti, M.P., Arriaga, J.M., Amat, M., Bruno, L., Pampena, M.B., Huertas, E., Loria, F.S., Pairola, A., Bianchini, M., et al. (2013). Altered phenotype in peripheral blood and tumor-associated NK cells from colorectal cancer patients. *Innate Immun.* 19, 76–85.
- 313- Rodrik-Outmezguine, V.S., Okaniwa, M., Yao, Z., Novotny, C.J., McWhirter, C., Banaji,

A., Won, H., Wong, W., Berger, M., de Stanchina, E., et al. (2016). Overcoming mTOR resistance mutations with a new-generation mTOR inhibitor. *Nature* 534, 272–276.

314- Romagné, F., André, P., Spee, P., Zahn, S., Anfossi, N., Gauthier, L., Capanni, M., Ruggeri, L., Benson, D.M., Blaser, B.W., et al. (2009). Preclinical characterization of 1-7F9, a novel human anti-KIR receptor therapeutic antibody that augments natural killer-mediated killing of tumor cells. *Blood* 114, 2667–2677.

315- Romee, R., Foley, B., Lenvik, T., Wang, Y., Zhang, B., Ankarlo, D., Luo, X., Cooley, S., Verneris, M., Walcheck, B., et al. (2013). NK cell CD16 surface expression and function is regulated by a disintegrin and metalloprotease-17 (ADAM17). *Blood* 121, 3599–3608.

316- Rosmaraki, E.E., Douagi, I., Roth, C., Colucci, F., Cumano, A., and Di Santo, J.P. (2001). Identification of committed NK cell progenitors in adult murine bone marrow. *Eur. J. Immunol.* 31, 1900–1909.

317- Rudnicka, D., Oszmiana, A., Finch, D.K., Strickland, I., Schofield, D.J., Lowe, D.C., Sleeman, M.A., and Davis, D.M. (2013). Rituximab causes a polarization of B cells that augments its therapeutic function in NK-cell-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Blood* 121, 4694–4702.

318- Ruggeri, L., Capanni, M., Urbani, E., Perruccio, K., Shlomchik, W.D., Tosti, A., Posati, S., Rogaia, D., Frassoni, F., Aversa, F., et al. (2002). Effectiveness of Donor Natural Killer Cell Alloreactivity in Mismatched Hematopoietic Transplants. *Science* 295, 2097–2100.

319- Sakuishi, K., Apetoh, L., Sullivan, J.M., Blazar, B.R., Kuchroo, V.K., and Anderson, A.C. (2010). Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *J. Exp. Med.* 207, 2187–2194.

320- Sancak, Y., Bar-Peled, L., Zoncu, R., Markhard, A.L., Nada, S., and Sabatini, D.M. (2010). Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell* 141, 290–303.

321- Sancho, D., Nieto, M., Llano, M., Rodríguez-Fernández, J.L., Tejedor, R., Avraham, S., Cabañas, C., López-Botet, M., and Sánchez-Madrid, F. (2000). The Tyrosine Kinase Pyk-2/Raftk Regulates Natural Killer (NK) Cell Cytotoxic Response, and Is Translocated and Activated upon Specific Target Cell Recognition and Killing. *J. Cell Biol.* 149, 1249–1262.

322- Sarhan, D., Cichocki, F., Zhang, B., Yingst, A., Spellman, S.R., Cooley, S., Verneris, M.R., Blazar, B.R., and Miller, J.S. (2016). Adaptive NK Cells with Low TIGIT Expression Are Inherently Resistant to Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Res.* 76, 5696–5706.

323- Sathe, P., Delconte, R.B., Souza-Fonseca-Guimaraes, F., Seillet, C., Chopin, M., Vandenberg, C.J., Rankin, L.C., Mielke, L.A., Vikstrom, I., Kolesnik, T.B., et al. (2014). Innate immunodeficiency following genetic ablation of Mcl1 in natural killer cells. *Nat. Commun.* 5, 4539.

324- Scharping, N.E., Menk, A.V., Moreci, R.S., Whetstone, R.D., Dadey, R.E., Watkins, S.C., Ferris, R.L., and Delgoffe, G.M. (2016). The Tumor Microenvironment Represses T Cell Mitochondrial Biogenesis to Drive Intratumoral T Cell Metabolic Insufficiency and Dysfunction. *Immunity* 45, 374–388.

325- Schietinger, A., Philip, M., Krisnawan, V.E., Chiu, E.Y., Delrow, J.J., Basom, R.S., 326-

- Lauer, P., Brockstedt, D.G., Knoblaugh, S.E., Hämmerling, G.J., et al. (2016). Tumor-Specific T Cell Dysfunction Is a Dynamic Antigen-Driven Differentiation Program Initiated Early during Tumorigenesis. *Immunity* *45*, 389–401.
- 326- Schlums, H., Cichocki, F., Tesi, B., Theorell, J., Beziat, V., Holmes, T.D., Han, H., Chiang, S.C.C., Foley, B., Mattsson, K., et al. (2015). Cytomegalovirus infection drives adaptive epigenetic diversification of NK cells with altered signaling and effector function. *Immunity* *42*, 443–456.
- 327- Schluns, K.S., Kieper, W.C., Jameson, S.C., and Lefrançois, L. (2000). Interleukin-7 mediates the homeostasis of naïve and memory CD8 T cells in vivo. *Nat. Immunol.* *1*, 426–432.
- 328- Schroder, K., Hertzog, P.J., Ravasi, T., and Hume, D.A. (2004). Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* *75*, 163–189.
- 329- Schurich, A., Pallett, L.J., Jajbhay, D., Wijngaarden, J., Otano, I., Gill, U.S., Hansi, N., Kennedy, P.T., Nastouli, E., Gilson, R., et al. (2016). Distinct Metabolic Requirements of Exhausted and Functional Virus-Specific CD8 T Cells in the Same Host. *Cell Rep.* *16*, 1243–1252.
- 330- Scott, A.C., Dündar, F., Zumbo, P., Chandran, S.S., Klebanoff, C.A., Shakiba, M., Trivedi, P., Menocal, L., Appleby, H., Camara, S.J., et al. (2019). TOX is a critical regulator of tumour-specific T cell differentiation. *Nature*.
- 331- Scott-Algara, D., Truong, L.X., Versmisse, P., David, A., Luong, T.T., Nguyen, N.V., Theodorou, I., Barré-Sinoussi, F., and Pancino, G. (2003). Cutting Edge: Increased NK Cell Activity in HIV-1-Exposed but Uninfected Vietnamese Intravascular Drug Users. *J. Immunol.* *171*, 5663–5667.
- 332- Screpanti, V., Wallin, R.P., Ljunggren, H.G., and Grandien, A. (2001). A central role for death receptor-mediated apoptosis in the rejection of tumors by NK cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *167*, 2068–2073.
- 333- Seidel, J.A., Otsuka, A., and Kabashima, K. (2018). Anti-PD-1 and Anti-CTLA-4 Therapies in Cancer: Mechanisms of Action, Efficacy, and Limitations. *Front. Oncol.* *8*.
- 334- Seidel, U.J.E., Schlegel, P., and Lang, P. (2013). Natural Killer Cell Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity in Tumor Immunotherapy with Therapeutic Antibodies. *Front. Immunol.* *4*.
- 335- Sen, D.R., Kaminski, J., Barnitz, R.A., Kurachi, M., Gerdemann, U., Yates, K.B., Tsao, H.-W., Godec, J., LaFleur, M.W., Brown, F.D., et al. (2016). The epigenetic landscape of T cell exhaustion. *Science* *354*, 1165–1169.
- 336- Senovilla, L., Vacchelli, E., Galon, J., Adjemian, S., Eggermont, A., Fridman, W.H., Sautès-Fridman, C., Ma, Y., Tartour, E., Zitvogel, L., et al. (2012). Trial watch. *Oncoimmunology* *1*, 1323–1343.
- 337- Seo, H., Jeon, I., Kim, B.-S., Park, M., Bae, E.-A., Song, B., Koh, C.-H., Shin, K.-S., Kim, I.-K., Choi, K., et al. (2017a). IL-21-mediated reversal of NK cell exhaustion facilitates anti-tumour immunity in MHC class I-deficient tumours. *Nat. Commun.* *8*, 15776.



- 338- Seo, H., Jeon, I., Kim, B.-S., Park, M., Bae, E.-A., Song, B., Koh, C.-H., Shin, K.-S., Kim, I.-K., Choi, K., et al. (2017b). IL-21-mediated reversal of NK cell exhaustion facilitates anti-tumour immunity in MHC class I-deficient tumours. *Nat. Commun.* **8**, 15776.
- 339- Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A.T., White, J.M., Swanson, P.E., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2001). IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* **410**, 1107–1111.
- 340- Shibuya, A., Campbell, D., Hannum, C., Yssel, H., Franz-Bacon, K., McClanahan, T., Kitamura, T., Nicholl, J., Sutherland, G.R., Lanier, L.L., et al. (1996). DNAM-1, a novel adhesion molecule involved in the cytolytic function of T lymphocytes. *Immunity* **4**, 573–581.
- 341- Shin, H., Blackburn, S.D., Blattman, J.N., and Wherry, E.J. (2007). Viral antigen and extensive division maintain virus-specific CD8 T cells during chronic infection. *J. Exp. Med.* **204**, 941–949.
- 342- da Silva, I.P., Gallois, A., Jimenez-Baranda, S., Khan, S., Anderson, A.C., Kuchroo, V.K., Osman, I., and Bhardwaj, N. (2014). Reversal of NK-cell exhaustion in advanced melanoma by Tim-3 blockade. *Cancer Immunol. Res.* **2**, 410–422.
- 343- Singer, M., Wang, C., Cong, L., Marjanovic, N.D., Kowalczyk, M.S., Zhang, H., Nyman, J., Sakuishi, K., Kurtulus, S., Gennert, D., et al. (2016). A Distinct Gene Module for Dysfunction Uncoupled from Activation in Tumor-Infiltrating T Cells. *Cell* **166**, 1500-1511.e9.
- 344- Sivori, S., Vitale, M., Morelli, L., Sanseverino, L., Augugliaro, R., Bottino, C., Moretta, L., and Moretta, A. (1997). p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule that mediates cell activation. *J. Exp. Med.* **186**, 1129–1136.
- 345- Slattery, K., Zaiatz-Bittencourt, V., Woods, E., Brennan, K., Marks, S., Chew, S., Conroy, M., Goggin, C., Kennedy, J., Finlay, D.K., et al. (2019). TGF $\beta$  drives mitochondrial dysfunction in peripheral blood NK cells during metastatic breast cancer. *BioRxiv*.
- 346- Smyth, M.J., Kelly, J.M., Baxter, A.G., Körner, H., and Sedgwick, J.D. (1998). An essential role for tumor necrosis factor in natural killer cell-mediated tumor rejection in the peritoneum. *J. Exp. Med.* **188**, 1611–1619.
- 347- Smyth, M.J., Thia, K.Y.T., Street, S.E.A., Cretney, E., Trapani, J.A., Taniguchi, M., Kawano, T., Pelikan, S.B., Crowe, N.Y., and Godfrey, D.I. (2000a). Differential Tumor Surveillance by Natural Killer (Nk) and Nkt Cells. *J. Exp. Med.* **191**, 661–668.
- 348- Smyth, M.J., Thia, K.Y., Street, S.E., MacGregor, D., Godfrey, D.I., and Trapani, J.A. (2000b). Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. *J. Exp. Med.* **192**, 755–760.
- 349- Smyth, M.J., Takeda, K., Hayakawa, Y., Peschon, J.J., van den Brink, M.R.M., and Yagita, H. (2003). Nature's TRAIL--on a path to cancer immunotherapy. *Immunity* **18**, 1–6.
- 350- Smyth, M.J., Cretney, E., Kelly, J.M., Westwood, J.A., Street, S.E.A., Yagita, H., Takeda, K., van Dommelen, S.L.H., Degli-Esposti, M.A., and Hayakawa, Y. (2005). Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol. Immunol.* **42**, 501–510.
- 351- Souza-Fonseca-Guimaraes, F., Cursons, J., and Huntington, N.D. (2019). The Emergence of Natural Killer Cells as a Major Target in Cancer Immunotherapy. *Trends*

Immunol. 40, 142–158.

352- Spits, H., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J.P., Eberl, G., Koyasu, S., Locksley, R.M., McKenzie, A.N.J., Mebius, R.E., et al. (2013). Innate lymphoid cells — a proposal for uniform nomenclature. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 145–149.

353- Srivastava, M.K., Zhu, L., Harris-White, M., Kar, U.K., Kar, U., Huang, M., Johnson, M.F., Lee, J.M., Elashoff, D., Strieter, R., et al. (2012). Myeloid suppressor cell depletion augments antitumor activity in lung cancer. *PLoS One* 7, e40677.

354- St John, A.L., Rathore, A.P.S., Yap, H., Ng, M.-L., Metcalfe, D.D., Vasudevan, S.G., and Abraham, S.N. (2011). Immune surveillance by mast cells during dengue infection promotes natural killer (NK) and NKT-cell recruitment and viral clearance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 9190–9195.

355- Stanietzky, N., Rovis, T.L., Glasner, A., Seidel, E., Tsukerman, P., Yamin, R., Enk, J., Jonjic, S., and Mandelboim, O. (2013). Mouse TIGIT inhibits NK-cell cytotoxicity upon interaction with PVR. *Eur. J. Immunol.* 43, 2138–2150.

356- Stannard, K.A., Lemoine, S., Waterhouse, N.J., Vari, F., Chatenoud, L., Gandhi, M.K., Martinet, L., Smyth, M.J., and Guillerey, C. (2019). Human peripheral blood DNAM-1neg NK cells are a terminally differentiated subset with limited effector functions. *Blood Adv.* 3, 1681–1694.

357- Stebbins, C.C., Watzl, C., Billadeau, D.D., Leibson, P.J., Burshtyn, D.N., and Long, E.O. (2003). Vav1 dephosphorylation by the tyrosine phosphatase SHP-1 as a mechanism for inhibition of cellular cytotoxicity. *Mol. Cell. Biol.* 23, 6291–6299.

358- Stewart, T.J., and Abrams, S.I. (2008). How tumours escape mass destruction. *Oncogene* 27, 5894–5903.

359- Street, S.E.A., Cretney, E., and Smyth, M.J. (2001). Perforin and interferon- $\gamma$  activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. 97, 7.

360- Stringaris, K., Sekine, T., Khoder, A., Alsuliman, A., Razzaghi, B., Sargeant, R., Pavlu, J., Brisley, G., de Lavallade, H., Sarvaria, A., et al. (2014). Leukemia-induced phenotypic and functional defects in natural killer cells predict failure to achieve remission in acute myeloid leukemia. *Haematologica* 99, 836–847.

361- Strunz, B., Hengst, J., Deterding, K., Manns, M.P., Cornberg, M., Ljunggren, H.-G., Wedemeyer, H., and Björkström, N.K. (2018). Chronic hepatitis C virus infection irreversibly impacts human natural killer cell repertoire diversity. *Nat. Commun.* 9.

362- Sun, C., Fu, B., Gao, Y., Liao, X., Sun, R., Tian, Z., and Wei, H. (2012). TGF- $\beta$ 1 Down-Regulation of NKG2D/DAP10 and 2B4/SAP Expression on Human NK Cells Contributes to HBV Persistence. *PLoS Pathog.* 8, e1002594.

363- Sun, C., Sun, H., Zhang, C., and Tian, Z. (2015). NK cell receptor imbalance and NK cell dysfunction in HBV infection and hepatocellular carcinoma. *Cell. Mol. Immunol.* 12, 292–302.

364- Sun, C., Xu, J., Huang, Q., Huang, M., Wen, H., Zhang, C., Wang, J., Song, J., Zheng, M., Sun, H., et al. (2017). High NKG2A expression contributes to NK cell exhaustion and



predicts a poor prognosis of patients with liver cancer. *Oncoimmunology* 6, e1264562.

365- Sun, H., Huang, Q., Huang, M., Wen, H., Lin, R., Zheng, M., Qu, K., Li, K., Wei, H., Xiao, W., et al. (2018). Human CD96 Correlates to Natural Killer Cell Exhaustion and Predicts the Prognosis of Human Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology*. Baltimore, Md.

366- Sun, J.C., Beilke, J.N., and Lanier, L.L. (2009). Adaptive immune features of natural killer cells. *Nature* 457, 557–561.

367- Sun, J.C., Lopez-Verges, S., Kim, C.C., DeRisi, J.L., and Lanier, L.L. (2011). NK cells and immune “memory.” *J. Immunol.* Baltimore, Md 190 186, 1891–1897.

368- Sutton, V.R., Davis, J.E., Cancilla, M., Johnstone, R.W., Ruefli, A.A., Sedelies, K., Browne, K.A., and Trapani, J.A. (2000). Initiation of Apoptosis by Granzyme B Requires Direct Cleavage of Bid, but Not Direct Granzyme B–Mediated Caspase Activation. *J. Exp. Med.* 192, 1403–1414.

369- Takeda, K., Tsutsui, H., Yoshimoto, T., Adachi, O., Yoshida, N., Kishimoto, T., Okamura, H., Nakanishi, K., and Akira, S. (1998). Defective NK cell activity and Th1 response in IL-18-deficient mice. *Immunity* 8, 383–390.

370- Takeda, K., Nakayama, M., Sakaki, M., Hayakawa, Y., Imawari, M., Ogasawara, K., Okumura, K., and Smyth, M.J. (2011). IFN- $\gamma$  production by lung NK cells is critical for the natural resistance to pulmonary metastasis of B16 melanoma in mice. *J. Leukoc. Biol.* 90, 777–785.

371- Tassi, I., Cella, M., Gilfillan, S., Turnbull, I., Diacovo, T.G., Penninger, J.M., and Colonna, M. (2007). p110 $\gamma$  and p110 $\delta$  Phosphoinositide 3-Kinase Signaling Pathways Synergize to Control Development and Functions of Murine NK Cells. *Immunity* 27, 214–227.

372- Thomas, D.A., Scorrano, L., Putcha, G.V., Korsmeyer, S.J., and Ley, T.J. (2001). Granzyme B can cause mitochondrial depolarization and cell death in the absence of BID, BAX, and BAK. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 14985–14990.

373- Thomas, L.M., Peterson, M.E., and Long, E.O. (2013). Cutting edge: NK cell licensing modulates adhesion to target cells. *J. Immunol.* Baltimore, Md 190 191, 3981–3985.

374- Thommen, D.S., and Schumacher, T.N. (2018). T Cell Dysfunction in Cancer. *Cancer Cell* 33, 547–562.

375- Tirosh, I., Izar, B., Prakadan, S.M., Wadsworth, M.H., Treacy, D., Trombetta, J.J., Rotem, A., Rodman, C., Lian, C., Murphy, G., et al. (2016). Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq. *Science* 352, 189–196.

376- Tjwa, E.T.T.L., van Oord, G.W., Hegmans, J.P., Janssen, H.L.A., and Woltman, A.M. (2011). Viral load reduction improves activation and function of natural killer cells in patients with chronic hepatitis B. *J. Hepatology*. 54, 209–218.

377- Tokoyoda, K., Egawa, T., Sugiyama, T., Choi, B.-I., and Nagasawa, T. (2004). Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development. *Immunity* 20, 707–718.

378- Tout, I., Gomes, M., Ainouze, M., Marotel, M., Pecoul, T., Durantel, D., Vaccarella, S.,

- 379- Dubois, B., Loustaud-Ratti, V., Walzer, T., et al. (2018). Hepatitis B Virus Blocks the CRE/CREB Complex and Prevents TLR9 Transcription and Function in Human B Cells. *J. Immunol.* *201*, 2331–2344.
- 380- Trapani, J.A., and Smyth, M.J. (2002). Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat. Rev. Immunol.* *2*, 735–747.
- 381- Utzschneider, D.T., Alfei, F., Roelli, P., Barras, D., Chennupati, V., Darbre, S., Delorenzi, M., Pinschewer, D.D., and Zehn, D. (2016). High antigen levels induce an exhausted phenotype in a chronic infection without impairing T cell expansion and survival. *J. Exp. Med.* *213*, 1819–1834.
- 382- Varchetta, S., Mele, D., Mantovani, S., Oliviero, B., Cremonesi, E., Ludovisi, S., Michelone, G., Alessiani, M., Rosati, R., Montorsi, M., et al. (2012). Impaired intrahepatic natural killer cell cytotoxic function in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* *56*, 841–849.
- 383- Vari, F., Arpon, D., Keane, C., Hertzberg, M.S., Talaulikar, D., Jain, S., Cui, Q., Han, E., Tobin, J., Bird, R., et al. (2018). Immune evasion via PD-1/PD-L1 on NK cells and monocyte/macrophages is more prominent in Hodgkin lymphoma than DLBCL. *Blood* *131*, 1809–1819.
- 384- Veillette, A. (2006). NK cell regulation by SLAM family receptors and SAP-related adapters. *Immunol. Rev.* *214*, 22–34.
- 385- Vesely, M.D., Kershaw, M.H., Schreiber, R.D., and Smyth, M.J. (2011). Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu. Rev. Immunol.* *29*, 235–271.
- 386- Vey, N., Dumas, P.-Y., Recher, C., Gastaud, L., Lioure, B., Bulabois, C.-E., Pautas, C., Marolleau, J.-P., Leprêtre, S., Raffoux, E., et al. (2017). Randomized Phase 2 Trial of Lirilumab (anti-KIR monoclonal antibody, mAb) As Maintenance Treatment in Elderly Patients (pts) with Acute Myeloid Leukemia (AML): Results of the Effikir Trial. *Blood* *130*, 889–889.
- 387- Viant, C., Fenis, A., Chicanne, G., Payrastre, B., Ugolini, S., and Vivier, E. (2014). SHP-1-mediated inhibitory signals promote responsiveness and anti-tumour functions of natural killer cells. *Nat. Commun.* *5*, 5108.
- 388- Viel, S., Marçais, A., Guimaraes, F.S.-F., Loftus, R., Rabilloud, J., Grau, M., Degouve, S., Djebali, S., Sanlaville, A., Charrier, E., et al. (2016). TGF- $\beta$  inhibits the activation and functions of NK cells by repressing the mTOR pathway. *Sci. Signal.* *9*, ra19.
- 389- Villegas, F.R., Coca, S., Villarrubia, V.G., Jiménez, R., Chillón, M.J., Jareño, J., Zuñil, M., and Callol, L. (2002). Prognostic significance of tumor infiltrating natural killer cells subset CD57 in patients with squamous cell lung cancer. *Lung Cancer* *35*, 23–28.
- 390- Vincent, I.E., Zannetti, C., Lucifora, J., Norder, H., Protzer, U., Hainaut, P., Zoulim, F., Tommasino, M., Trépo, C., Hasan, U., et al. (2011). Hepatitis B Virus Impairs TLR9 Expression and Function in Plasmacytoid Dendritic Cells. *PLOS ONE* *6*, e26315.
- 391- Vivier, E., Nunès, J.A., and Vély, F. (2004). Natural Killer Cell Signaling Pathways. *Science* *306*, 1517–1519.

- 392- Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., and Ugolini, S. (2008). Functions of natural killer cells. *Nat. Immunol.* **9**, 503–510.
- 393- Vivier, E., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J.P., Eberl, G., Koyasu, S., Locksley, R.M., McKenzie, A.N.J., Mebius, R.E., et al. (2018). Innate Lymphoid Cells: 10 Years On. *Cell* **174**, 1054–1066.
- 394- Waggoner, S.N., Cornberg, M., Selin, L.K., and Welsh, R.M. (2011). Natural killer cells act as rheostats modulating antiviral T cells. *Nature* **481**, 394–398.
- 395- Wagner, J.A., Rosario, M., Romee, R., Berrien-Elliott, M.M., Schneider, S.E., Leong, J.W., Sullivan, R.P., Jewell, B.A., Becker-Hapak, M., Schappe, T., et al. (2017). CD56bright NK cells exhibit potent antitumor responses following IL-15 priming. *J. Clin. Invest.* **127**, 4042–4058.
- 396- Walzer, T., Bléry, M., Chaix, J., Fuseri, N., Chasson, L., Robbins, S.H., Jaeger, S., André, P., Gauthier, L., Daniel, L., et al. (2007a). Identification, activation, and selective *in vivo* ablation of mouse NK cells via NKp46. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 3384–3389.
- 397- Walzer, T., Chiossone, L., Chaix, J., Calver, A., Carozzo, C., Garrigue-Antar, L., Jacques, Y., Baratin, M., Tomasello, E., and Vivier, E. (2007b). Natural killer cell trafficking *in vivo* requires a dedicated sphingosine 1-phosphate receptor. *Nat. Immunol.* **8**, 1337–1344.
- 398- Wang, J.M., Cheng, Y.Q., Shi, L., Ying, R.S., Wu, X.Y., Li, G.Y., Moorman, J.P., and Yao, Z.Q. (2013). KLRG1 negatively regulates natural killer cell functions through the Akt pathway in individuals with chronic hepatitis C virus infection. *J. Virol.* **87**, 11626–11636.
- 399- Wang, M., Liang, C., Hu, H., Zhou, L., Xu, B., Wang, X., Han, Y., Nie, Y., Jia, S., Liang, J., et al. (2016). Intraperitoneal injection (IP), Intravenous injection (IV) or anal injection (AI)? Best way for mesenchymal stem cells transplantation for colitis. *Sci. Rep.* **6**.
- 400- Warfield, K.L., Perkins, J.G., Swenson, D.L., Deal, E.M., Bosio, C.M., Aman, M.J., Yokoyama, W.M., Young, H.A., and Bavari, S. (2004). Role of Natural Killer Cells in Innate Protection against Lethal Ebola Virus Infection. *J. Exp. Med.* **200**, 169–179.
- 401- Warren, H.S., Kinnear, B.F., Phillips, J.H., and Lanier, L.L. (1995). Production of IL-5 by human NK cells and regulation of IL-5 secretion by IL-4, IL-10, and IL-12. *J. Immunol. Baltim. Md* **154**, 5144–5152.
- 402- Wei, S., Gamero, A.M., Liu, J.H., Daulton, A.A., Valkov, N.I., Trapani, J.A., Lerner, A.C., Weber, M.J., and Djeu, J.Y. (1998). Control of lytic function by mitogen-activated protein kinase/extracellular regulatory kinase 2 (ERK2) in a human natural killer cell line: identification of perforin and granzyme B mobilization by functional ERK2. *J. Exp. Med.* **187**, 1753–1765.
- 403- van der Weyden, L., Arends, M.J., Campbell, A.D., Bald, T., Wardle-Jones, H., Griggs, N., Velasco-Herrera, M.D.C., Tüting, T., Sansom, O.J., Karp, N.A., et al. (2017). Genome-wide *in vivo* screen identifies novel host regulators of metastatic colonization. *Nature* **541**, 233–236.
- 404- Wherry, E.J. (2011). T cell exhaustion. *Nat. Immunol.* **12**, 492–499.
- 405- Wherry, E.J., Blattman, J.N., Murali-Krishna, K., van der Most, R., and Ahmed, R.

- (2003). Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment. *J. Virol.* 77, 4911–4927.
- 406- Wherry, E.J., Ha, S.-J., Kaech, S.M., Haining, W.N., Sarkar, S., Kalia, V., Subramaniam, S., Blattman, J.N., Barber, D.L., and Ahmed, R. (2007). Molecular Signature of CD8+ T Cell Exhaustion during Chronic Viral Infection. *Immunity* 27, 670–684.
- 407- Workman, C.J., and Vignali, D.A.A. (2003). The CD4-related molecule, LAG-3 (CD223), regulates the expansion of activated T cells. *Eur. J. Immunol.* 33, 970–979.
- 408- Wu, J., Song, Y., Bakker, A.B., Bauer, S., Spies, T., Lanier, L.L., and Phillips, J.H. (1999). An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science* 285, 730–732.
- 409- Xu, F., Liu, J., Liu, D., Liu, B., Wang, M., Hu, Z., Du, X., Tang, L., and He, F. (2014). LSECTin expressed on melanoma cells promotes tumor progression by inhibiting antitumor T-cell responses. *Cancer Res.* 74, 3418–3428.
- 410- Yang, X., Stennicke, H.R., Wang, B., Green, D.R., Jänicke, R.U., Srinivasan, A., Seth, P., Salvesen, G.S., and Froelich, C.J. (1998). Granzyme B Mimics Apical Caspases: DESCRIPTION OF A UNIFIED PATHWAY FOR TRANS-ACTIVATION OF EXECUTIONER CASPASE-3 AND -7. *J. Biol. Chem.* 273, 34278–34283.
- 411- Yao, C., Sun, H.-W., Lacey, N.E., Ji, Y., Moseman, E.A., Shih, H.-Y., Heuston, E.F., Kirby, M., Anderson, S., Cheng, J., et al. (2019). Single-cell RNA-seq reveals TOX as a key regulator of CD8+ T cell persistence in chronic infection. *Nat. Immunol.* 20, 890–901.
- 412- Yapali, S., Talaat, N., and Lok, A.S. (2014). Management of hepatitis B: our practice and how it relates to the guidelines. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* 12, 16–26.
- 413- Yong, C.S.M., Dardalhon, V., Devaud, C., Taylor, N., Darcy, P.K., and Kershaw, M.H. (2017). CAR T-cell therapy of solid tumors. *Immunol. Cell Biol.* 95, 356–363.
- 414- Yu, J., Freud, A.G., and Caligiuri, M.A. (2013). Location and cellular stages of natural killer cell development. *Trends Immunol.* 34, 573–582.
- 415- Yu, X., Harden, K., Gonzalez, L.C., Francesco, M., Chiang, E., Irving, B., Tom, I., Ivelja, S., Refino, C.J., Clark, H., et al. (2009). The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells. *Nat. Immunol.* 10, 48–57.
- 416- Yu, Y., Hagihara, M., Ando, K., Gansuud, B., Matsuzawa, H., Tsuchiya, T., Ueda, Y., Inoue, H., Hotta, T., and Kato, S. (2001). Enhancement of Human Cord Blood CD34+ Cell-Derived NK Cell Cytotoxicity by Dendritic Cells. *J. Immunol.* 166, 1590–1600.
- 417- Zajac, A.J., Blattman, J., Murali-Krishna, K., Sourdive, D.J.D., Suresh, M., Altman, J.D., and Ahmed, R. (1998). Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J. Exp. Med.* 188, 2205–2213.
- 418- Zarcone, D., Prasthofer, E.F., Malavasi, F., Pistoia, V., LoBuglio, A.F., and Grossi, C.E. (1987). Ultrastructural analysis of human natural killer cell activation. *Blood* 69, 1725–1736.

- 419- Zhang, C., Wang, X.-M., Li, S.-R., Twelkmeyer, T., Wang, W.-H., Zhang, S.-Y., Wang, S.-F., Chen, J.-Z., Jin, X., Wu, Y.-Z., et al. (2019). NKG2A is a NK cell exhaustion checkpoint for HCV persistence. *Nat. Commun.* *10*, 1507.
- 420- Zhang, J., Marotel, M., Fauteux-Daniel, S., Mathieu, A.-L., Viel, S., Marçais, A., and Walzer, T. (2018a). T-bet and Eomes govern differentiation and function of mouse and human NK cells and ILC1. *Eur. J. Immunol.* *48*, 738–750.
- 421- Zhang, J.-G., Farley, A., Nicholson, S.E., Willson, T.A., Zugaro, L.M., Simpson, R.J., Moritz, R.L., Cary, D., Richardson, R., Hausmann, G., et al. (1999). The conserved SOCS box motif in suppressors of cytokine signaling binds to elongins B and C and may couple bound proteins to proteasomal degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 2071–2076.
- 422- Zhang, Q., Bi, J., Zheng, X., Chen, Y., Wang, H., Wu, W., Wang, Z., Wu, Q., Peng, H., Wei, H., et al. (2018b). Blockade of the checkpoint receptor TIGIT prevents NK cell exhaustion and elicits potent anti-tumor immunity. *Nat. Immunol.* *19*, 723.
- 423- Zhang, Q.-F., Yin, W.-W., Xia, Y., Yi, Y.-Y., He, Q.-F., Wang, X., Ren, H., and Zhang, D.-Z. (2017). Liver-infiltrating CD11b-CD27- NK subsets account for NK-cell dysfunction in patients with hepatocellular carcinoma and are associated with tumor progression. *Cell. Mol. Immunol.* *14*, 819–829.
- 424- Zhao, J., Zhai, B., Gygi, S.P., and Goldberg, A.L. (2015). mTOR inhibition activates overall protein degradation by the ubiquitin proteasome system as well as by autophagy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *112*, 15790–15797.
- 425- Zhou, G., Juang, S.W.W., and Kane, K.P. (2013). NK cells exacerbate the pathology of influenza virus infection in mice. *Eur. J. Immunol.* *43*, 929–938.
- 426- Zhu, Y., Huang, B., and Shi, J. (2016). Fas ligand and lytic granule differentially control cytotoxic dynamics of natural killer cell against cancer target. *Oncotarget* *7*, 47163–47172.
- 427- Zimmer, J., Donato, L., Hanau, D., Cazenave, J.-P., Tongio, M.-M., Moretta, A., and de la Salle, H. (1998). Activity and Phenotype of Natural Killer Cells in Peptide Transporter (TAP)-deficient Patients (Type I Bare Lymphocyte Syndrome). *J. Exp. Med.* *187*, 117–122. (2009). Ueber den jetzigen Stand der Karzinomforschung.
- 428- (2012). *Control of Innate and Adaptive Immune Responses during Infectious Diseases* (New York: Springer-Verlag).