



HAL
open science

Étude du rôle de l'Interleukine-33 dans l'activation des cellules NK et de leur activité anti-tumorale dans le cancer du sein

Anaïs Eberhardt

► **To cite this version:**

Anaïs Eberhardt. Étude du rôle de l'Interleukine-33 dans l'activation des cellules NK et de leur activité anti-tumorale dans le cancer du sein. Immunologie. Université de Lyon, 2020. Français. NNT : 2020LYSE1196 . tel-03416935

HAL Id: tel-03416935

<https://theses.hal.science/tel-03416935v1>

Submitted on 5 Nov 2021

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 :2020LYSE1196

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 340
Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire

Spécialité de doctorat : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Discipline : Immunologie

Soutenue publiquement le 19/10/2020, par :

Anaïs Eberhardt

Étude du rôle de l'Interleukine-33 dans l'activation des cellules NK et de leur activité anti-tumorale dans le cancer du sein

Devant le jury composé de :

GUERRA Nadia
GIRARD Jean-Philippe
CHAPUT Nathalie
BERNET Agnès
MARCAIS Antoine
BENDRISS-VERMARE Nathalie

Dr, Imperial College, London
DR, IPBS, Toulouse
PU-PH, IGR, Paris
PU, CRCL, Lyon
CR, CIRI, Lyon
CR, CRCL, Lyon

Rapporteuse
Rapporteur
Examinatrice
Examinatrice
Examineur
Directrice de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Vice-président du Conseil Académique
Vice-président du Conseil d'Administration
Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire
Vice-président de la Commission Recherche
Directeur Général des Services

M. le Professeur Frédéric FLEURY

M. le Professeur Hamda BEN HADID
M. le Professeur Didier REVEL
M. le Professeur Philippe CHEVALIER
M. Jean-François MORNEX
M. Damien VERHAEGHE

COMPOSANTES SANTÉ

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux
Faculté d'Odontologie
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation
Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Doyen : M. Gilles RODES
Doyenne : Mme. Carole BURILLON
Doyenne : Mme Dominique SEUX
Directeur : Mme. Christine VINCIGUERRA
Directeur : M. Xavier PERROT
Directeur : Mme. Anne-Marie SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

UFR Biosciences
Département Génie Electrique et des Procédés
Département Informatique
Département Mécanique
UFR – Faculté des Sciences
UFR STAPS
Observatoire de Lyon
Ecole Polytechnique Universitaire Lyon 1
Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon)
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1
Institut de Science Financière et d'Assurances
Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education (ESPE)

Directrice : Mme Kathrin GIESELER
Directrice : Mme. Rosaria FERRIGNO
Directeur : M. Behzad SHARIAT
Directeur : M. Marc BUFFAT
Administrateur provisoire : M. Bruno ANDRIOLETTI
Directeur : M. Y. VANPOULLE
Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Directeur : M. Emmanuel PERRIN
Directeur : M. Gérard PIGNAULT
Directeur : M. Christophe VITON
Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
Administrateur provisoire : M. Pierre CHAREYRON

Remerciements

J'adresse mes très sincères remerciements aux membres de mon jury de thèse pour avoir accepté d'évaluer mon travail. Mes rapporteurs, le **Dr. Nadia Guerra** et le **Dr. Jean-Philippe Girard**, pour leur intérêt pour notre projet et leurs précieux conseils lors de la révision de ce manuscrit, ainsi que la **Pr. Nathalie Chaput** pour avoir volontiers accepté d'évaluer ce travail en qualité d'examinatrice. Je remercie chaleureusement le **Dr. Antoine Marçais** pour sa participation à ma soutenance de thèse et à mes comités de suivis de thèse, et plus généralement pour sa bienveillance tout au long de mon parcours. Je souhaite enfin remercier la **Pr. Agnès Bernet** d'avoir accepté de présider mon jury de thèse, en tant que scientifique dont j'admire le parcours mais également en tant qu'amie de mes parents, qui m'a suivie et largement conseillée depuis les prémices de mon parcours professionnel.

Je remercie également nos collaborateurs, le **Dr. Philippe Krebs** à l'université de Bern, le **Dr. Antoine Marçais** et le **Dr. Thierry Walzer** au CIRI pour nous avoir accordé leur confiance et œuvré pour mener ce projet toujours plus loin. Je remercie les divers organismes et associations qui ont soutenu financièrement ce projet. Je remercie également toutes les personnes qui ont œuvré, de près ou de loin, au développement des protocoles nous permettant d'avoir accès à des échantillons biologiques précieux. Je remercie enfin tous les patients et donneurs sains qui ont participé, anonymement, à la réalisation de ce travail en effectuant les plus beaux des dons.

Je souhaite remercier le **Dr. Karène Mathouk**, qui m'a enseigné pour la toute première fois l'immunologie, discipline qui n'a jamais cessé de me fasciner depuis ce jour. Je remercie également l'ensemble de l'équipe pédagogique d'immunologie de l'université Claude Bernard, la **Pr. Christine Delprat**, le **Pr. Mathias Faure**, le **Dr. Aurore Rozières**, le **Dr. Emilie Bourdonnais** et le **Dr. Olivier Diaz** pour m'avoir donné une chance de transmettre à mon tour ce précieux savoir.

Je tiens à exprimer ma gratitude envers le **Dr. Christophe Caux**, qui m'a permis de réaliser un de mes rêves en m'accueillant dans son laboratoire pour effectuer ma thèse. Ta connaissance scientifique sans limite n'a cessé de me surprendre et de m'émerveiller lors de ces années. Je garde également une certaine fierté pour avoir réussi à te faire rire lors d'une de nos réunions de sous-groupe. Merci d'avoir fait de ce rêve un accomplissement.

Je remercie amicalement le **Dr. Nathalie Bendriss-Vermare**, ma directrice de thèse, pour m'avoir accordé toute ta confiance pour la réalisation de ce projet ainsi qu'une grande liberté qui m'a permis de m'épanouir scientifiquement. Ta conviction dans ton métier et ta force de caractère ont été une source d'admiration. Ta sensibilité professionnelle et personnelle ont été une source d'inspiration. Ton intégrité scientifique et ta capacité à te passionner pour une multitude de thématiques ont forgé mon esprit scientifique. Merci d'avoir veillé sur moi et d'avoir tant partagé. Je te souhaite de continuer à t'épanouir et j'espère vivement que l'on gardera ce lien particulier.

Je me dois à présent de remercier sincèrement l'ensemble des personnes qui constituent, ont constitué cette grande et belle équipe. L'équipe Caux, c'est un peu comme un panel de cytométrie multi-paramétrique : ça demande un peu de mise au point mais quand ça fonctionne, ça en jette !

Je remercie l'ensemble des « PIs » de l'équipe pour votre dévouement, votre accompagnement scientifique et l'énergie que vous déployez pour nous permettre de travailler dans les meilleures conditions. Avec Christophe, vous êtes les capitaines et les chefs d'équipage d'un très

beau navire. Vous pouvez en être fiers et je ne peux que vous inciter de continuer à prendre soin de ce navire afin de mener à bon port l'ensemble de votre équipage, présent et futur.

Jenny, sincèrement, ne change rien ! Sauf peut-être ta sonnerie de téléphone ? **Marie-Cécile**, garde cette énergie si communicative ! **Christine**, merci d'avoir partagé ta sensibilité à de nombreuses reprises avec moi. **Bertrand**, je te remercie pour ton esprit *critique* qui m'a permis d'exercer le mien sans relâche. **Stéphane**, merci de croire autant en moi !

Dans ce panel 14 couleurs, j'ai pu côtoyer une diversité remarquable de personnalités et une multitude de qualités humaines.

Marion, mon phare, mon roc. Un condensé de bonne humeur, d'amour et de caractère comme on en fait peu de nos jours. Sans hésitation l'une des plus belles leçons que j'ai reçues au cours de cette thèse. Si tu étais un fluorochrome, tu serais forcément le plus fort et le plus brillant. Alors merci mon Amie, de m'avoir fait grandir, de m'avoir soutenu et de m'avoir tant fait rire au quotidien.

Margaux, mon autre très belle Amie de cette thèse, j'éprouve une certaine admiration pour ce que tu as accompli et la douceur avec laquelle tu le fais. Une copine de labo, une copine de bijoux, une copine de tri et une copine de Suze. Je te remercie infiniment de m'avoir offert le titre de « tata Nanas », vraiment, Merci. **Adèle**, de loin la plus jeune recrue de l'équipe, te rencontrer était une chance, tu m'émerveilles par ta vivacité d'esprit et ta spontanéité. Je te remercie de m'avoir appris à différencier un hibou d'une chouette. J'ai hâte de te voir grandir.

Amélien, c'était pour moi un honneur d'être la secrétaire de quelqu'un d'aussi populaire... mais surtout un immense honneur d'être ton amie. Tu sais prendre soin des autres comme personne et ta disponibilité sans faille m'a permis de me sentir choyée. Tu sais également manier comme personne l'art de la blague grivoise ! Je te serai éternellement reconnaissante ... pour m'avoir aidée avec cette foutue table des matières !

Pacôme, mon Michel Berger, nous avons fait ce parcours en duo et je te remercie pour ton œil toujours bienveillant et pétillant. Ta personnalité est riche et complexe comme je les aime, je suis ravie d'avoir fait ce chemin avec toi. Bienvenue à Simon, et je tiens à te partager mon admiration pour ces années remplies d'accomplissements !

Yamila, une explosion de saveurs, je suis *très* contente que nos chemins se soient croisés, j'admire ton énergie de vie et ta positivité sans faille. Alors, je t'entends déjà me chanter « porque te vas » ... ¡Pero no te olvidaré así!

Paola, ton caractère de feu mais également ta bienveillance de tous les jours ont largement participé à rendre le quotidien plus léger et agréable. Je compte bien te retrouver sur les dancefloors de nos clubs préférés pour continuer à partager de beaux moments ensemble.

Vincent, ton humour et ta vivacité d'esprit ont fait de chacun des moments partagés un véritable plaisir. J'ai vraiment hâte de devenir ta chef chez ErVaccine ! Et n'oublie pas : Sale del ordenador !

Aurélien, ton rire est si communicatif ; serait-ce finalement le point commun des membres du sous-groupe NBV ? Je te remercie pour ta disponibilité et surtout d'avoir partagé avec moi tes conseils pour, je cite, « bien vivre au travail en étant beau gosse » !

Lyvia, ta générosité n'a d'égal que ta gourmandise, je te remercie d'avoir apporté tant de vie sur la côte ouest de l'open space !

Céline, ta gentillesse et ta bienveillance m'ont accompagnée tout au long de cette aventure. Ta disponibilité et ton engagement pour le bon fonctionnement de notre équipe sont essentiels à sa pérennité. Je resterai toujours disponible pour te préparer des carnets de route pour tes prochains voyages.

Laurie, bien que récemment arrivée dans l'équipe, ton altruisme et ton sens du partage m'ont fait beaucoup de bien, je suis sûre que tu apporteras beaucoup à l'ensemble de l'équipe. Crois en toi.

Yasmine, fournisseur officiel de dattes non périmées ! Merci pour ta curiosité et ta douceur, je te souhaite tout le meilleur pour la suite de ton parcours.

Maude, je m'excuse d'avoir annexé ton bureau environ deux jours après ton arrivée. Je te remercie pour ta disponibilité et d'avoir su faire preuve d'une grande patience pour m'aider à apprivoiser cette discipline obscure qu'est la bio-informatique...

Les petits nouveaux que l'on apprend à connaître : **Valentin, Manuela, Candice** ; je vous souhaite de faire une très belle route, de prendre soin de vous et surtout de prendre beaucoup de plaisir dans ce que vous faites. Croyez en vous !

Je tiens également à remercier les « stagiaires » que j'ai eu la chance d'encadrer, vous avez chacun apporté quelque chose d'original et d'unique à cette aventure. Mes pédiatres préférés : **Benoît**, ton humour et ta curiosité ont édulcoré cette année où nous avons travaillé ensemble. Je te suis infiniment reconnaissante pour tes conseils médicaux en cas de coton tige coincé dans l'oreille à 7h du matin. **Mathilde**, je suis *extrêmement* heureuse d'avoir fait ta connaissance et d'avoir partagé ces moments avec toi. Ton humour mais aussi ta bienveillance ont sans aucun doute adouci cette aventure. Je te remercie également pour avoir veillé sur mon calendrier vaccinal ! Enfin, *last but not least*, **Benjamin**, ton humilité et ta capacité de remise en question resteront pour moi un modèle.

Dominique et Anne-Claire, votre binôme, essentiel au bon fonctionnement du laboratoire, n'en est pas moins touchant et attachant. Je vous remercie pour votre bienveillance quotidienne.

Mes collègues et amis médecins, **Mathilde, Olivia, Elisa, Vincent, Benoît, Matthieu** ; je vous remercie de m'avoir permis de vous accompagner, de loin ou de très près, dans l'exercice de votre métier que j'admire tant. Ce fut une expérience intense mais si enrichissante qui restera ancrée en moi.

Enfin il y a les anciens, qui sont sortis du panel mais qui ont tant participé à faire de cette aventure ce qu'elle représente aujourd'hui. **Fanny**, le soleil de ma plage, ce fut un immense plaisir de travailler à tes côtés, le comité des fêtes de l'animalerie et moi-même te remercie sincèrement ! **Odile**, je ne saurais compter le nombre d'éclats de rires partagés, je te remercie pour ton écoute, ta joie de vivre et ta fidélité, même depuis ton petit pays luxembourgeois. **Suzanne**, un immense merci pour avoir enrichi mon vocabulaire patois, merci également pour ta spontanéité et ton amitié. J'espère que nous arriverons à ne pas perdre contact. **Nicolas**, j'ai été très heureuse de partager l'écriture de (ta) thèse avec toi, tes livraisons nocturnes de Mc Flurry ont sans aucun doute participé à la réussite de quelques manips ! **Coline**, ta sensibilité et ta persévérance ont été un exemple quotidien de force et de pugnacité. Merci d'avoir veillé sur moi ces quelques années. Enfin, **Elena**, tu as initié et largement contribué à ce projet, pour cela je tiens à te témoigner ma reconnaissance. A travers ton encadrement, tu m'as transmis ta passion et ta rigueur scientifique, je te remercie de m'avoir légué ces valeurs qui te sont si chères.

Puis, au-delà de l'équipe Caux, je souhaite remercier toutes les personnes du centre qui ont participé de près ou de loin à cette aventure.

Giacomo, les pauses cafés à t'écouter parler ont été une véritable soupape pour évacuer les tensions. Je suis très heureuse d'avoir fait ta connaissance et partagé de nombreuses soirées animées avec toi.

Dorian, un concentré de gentillesse, d'énergie et d'engagement pour la communauté. Nos chemins ont été étroitement liés jusqu'ici et je te souhaite désormais une très bonne route, j'espère vivement que nous nous recroiserons très vite.

Alexandra, je te remercie pour ta disponibilité sans faille, pour une assistance technique Fortessa mais surtout pour partager de bons petits plats et quelques potins.

Simon, ta finesse d'esprit et ta disponibilité ont permis d'adoucir ces quelques mois de confinement et pour cela je te remercie sincèrement. Je te remercie également pour ton immense curiosité scientifique et ton intérêt pour notre projet.

Yenkel, ta vivacité d'esprit et tes conseils, tant scientifiques que personnels, ont toujours été une grande source d'inspiration. Je t'en remercie chaleureusement.

L'équipe de choc de l'animalerie : **Manon, Blandine, Maxime et Bastien**. Sans votre aide, une partie de cette thèse n'aurait jamais pu être accomplie. Je vous remercie pour votre disponibilité et votre gentillesse à toute épreuve.

En dehors du cadre professionnel, il y a tant de personnes sans qui tout cela n'aura pas été possible. Votre présence et votre soutien permanent m'ont permis de continuer à avancer, toujours plus loin et d'être toujours plus épanouie.

Anaïs et Claudia, mes meilleures Amies, vous m'avez aidé à grandir, à me construire et à m'épanouir. Je ne saurai vous dire tout mon amitié à travers ces quelques lignes mais je tenais à vous remercier pour votre soutien sans faille depuis toutes ces années. Je me sens fière et chanceuse de vous avoir à mes côtés, pour encore de très belles années.

Benoît, ton amitié et ton humour sans limite ont largement contribué à rendre ces années complètement barrées, comme je les aime. Je te remercie d'avoir assuré la propreté de mon logis pendant de longs mois ; finalement je ne sais pas à qui aura le plus bénéficié cette colocation improvisée... **Dimitri**, ta fidélité et ta bienveillance me sont très chères, je suis très heureuse de partager ces moments précieux avec toi depuis le CP ;)

Yohann, ta bonne humeur constante et ton amitié à toute épreuve m'ont accompagnée et portée durant cette aventure, et pour encore de longues années à venir !

Mes amis rencontrés sur les bancs de l'université ; **Dorian**, je te remercie pour ton humour sans faille, ta bienveillance et la patience dont tu as su faire preuve face à une Anaïs un peu angoissée par les travaux de son appartement. **Margaux**, ta spontanéité et ta force de caractère ont toujours été une source d'admiration pour moi. Je te remercie de m'avoir tant fait rire et d'avoir toujours été une amie si fidèle. **Paola**, ta finesse d'esprit et ta sincérité m'ont immédiatement séduite. Beaucoup d'éléments nous rapprochent, je suis très heureuse d'avoir fait ta rencontre et de te compter parmi mes amis. **Pauline**, ta bienveillance n'a pas de limite et j'ai savouré tous les moments partagés avec toi tant notre complicité est naturelle. Merci d'avoir tant partagé avec moi.

Mes amis rencontrés sur les bancs de l'ENS, avec qui j'ai partagé bien plus qu'une avidité grandissante pour la recherche. **Anouk**, ma chimère, notre amitié fusionnelle dès les premiers instants aura été si enrichissante. J'ai hâte de te retrouver, de nous voir grandir et nous épanouir, toujours l'une aux côtés de l'autre. **Fleur**, ta fraîcheur et ta légèreté ont illuminé ces années passées à tes côtés, depuis notre colocation jusqu'à l'écriture ensemble de nos thèses respectives. J'ai toujours pu compter sur toi et pour cela je te suis éternellement reconnaissante. **Arthur**, ton intelligence et ta sincérité m'ont accompagnée toutes ces années. Je garde de si bons souvenirs, tant nos discussions intenses et profondes que de nos soirées légères et délirantes. **Marianne**, ta douceur et ta culture ont toujours suscité en moi une grande admiration. Tu as toujours su t'intéresser à mon projet, pourtant si éloigné de ton domaine de prédilection, avec une étincelle dans tes yeux qui a de nombreuses fois ravivé celle dans les miens.

Quentin, je te remercie de m'avoir soutenue et accompagnée dans cette grande aventure que nous avons initiée ensemble. Je garde précieusement tous les beaux souvenirs partagés.

Ma maison de campagne en Ardèche, dont les fondations ont été construites par toi, **Thibaut**, et ta capacité à rassembler les personnes autour de toi, de par ta gentillesse et ton authenticité. Puis au fil des années, les étages de cette maison se sont construits, pour accueillir désormais un salon où se tiennent des discussions profondes et animées, une cuisine toujours remplie de bons mets et de bons vins, de nombreuses chambres pour accueillir tous les membres de cette grande famille et bien évidemment un sous-sol pour des nuits toujours très sonores. Mais une maison n'est rien sans les personnes qui l'habitent. **Léa** et **Rosalie**, vous me comblez de bienveillance, de rires, de joies mais aussi d'admiration mutuelle qui fait la force de notre belle amitié. **Thibaut M.**, **Thibaut T.**, **Baptiste**, **Pierre** et **Arthur** ; tantôt DJ, parfois jardiniers ou piscinistes, mais toujours présents. Votre amitié et votre bonne humeur sont communicatifs et m'ont portée tout au long de ma thèse.

Et puis parfois, nous invitons nos cousins parisiens à venir passer quelques jours en province pour que la fête soit encore plus belle. **Elodie**, **Mathilde**, **Antoine C.**, **Antoine B.**, **Tanguy** et **Thimotée**, je vous remercie d'avoir animé les nombreuses soirées de nouvel an d'hiver et d'été.

Je tiens également à remercier tous les restaurateurs et barmens de Lyon qui ont largement contribué à la réussite de cette thèse en m'offrant l'opportunité de me réunir avec vous tous pour évacuer la pression parfois un peu trop pesante.

Enfin, je remercie *infiniment* ma famille. **Maman**, **Papa** ; votre courage et vos accomplissements sont pour moi une source d'inspiration et d'admiration permanente. Les valeurs que vous nous avez transmises font aujourd'hui la personne que je suis et que je souhaite devenir. Votre amour inconditionnel et votre soutien indéfectible m'ont permis de mener à bien cette intense et périlleuse entreprise qu'est la thèse. **Maxime**, **Florian**, **Jill** ; ce que vous êtes et ce que vous avez accompli a été et continuera d'être un exemple. L'admiration que vous me témoignez est un moteur qui m'a aidée et qui m'aidera toujours à me surpasser, pour vous rendre fiers. Aujourd'hui cette réussite n'est pas la mienne mais la **nôtre**.

Table des matières

Préambule	15
Introduction	17
Chapitre 1 : Biologie des cellules Natural Killer (NK)	19
I. Identification des cellules NK et généralités.....	19
II. Développement des cellules NK humaines	20
III. Localisation des cellules NK.....	22
IV. Activation et régulation fonctionnelle des cellules NK.....	23
1. Equilibre entre récepteurs inhibiteurs et activateurs.....	25
1.1. Récepteurs inhibiteurs	26
1.2. Récepteurs activateurs.....	27
1.3. Immune checkpoints régulateurs.....	28
1.4. Rôle des molécules de co-stimulation et d'adhérence	29
2. Rôle des cytokines	31
3. Rôle des récepteurs de l'immunité innée	35
V. Fonctions effectrices et régulatrices des cellules NK.....	35
1. Fonction cytotoxique des cellules NK.....	37
1.1. Cytotoxicité directe	37
1.2. Cytotoxicité dépendante des anticorps ou ADCC	38
1.3. Rôle régulateur de l'activité cytotoxique des cellules NK	38
2. Fonction sécrétrice des cellules NK	39
VI. Diversité phénotypique et fonctionnelle des cellules NK.....	41
1. La dichotomie CD56 ^{bright} et CD56 ^{dim} chez l'homme	41
2. Différenciation et maturation tardive des cellules NK CD56 ^{dim}	43
3. Sous-types de cellules NK chez la souris.....	45
VII. Cellules NK et mémoire immunitaire	45
1. Preuve de concept : expansion, contraction, maintenance	45
2. Phénotype et différenciation des cellules NK mémoires	46
VIII. Régulation transcriptionnelle et épigénétique de la différenciation des cellules NK	48
IX. Cellules NK et cancer	49
1. Phénotypage des cellules NK dans les tumeurs humaines	50
2. Surveillance anti-tumorale médiée par les cellules NK	51
2.1. Preuves de concept chez la souris.....	51
2.2. Mise en évidence chez l'homme	52
3. Echappement à l'immunosurveillance médiée par les cellules NK.....	54
3.1. Résistance des cellules tumorales à l'activité des cellules NK	54
3.2. Altérations des cellules NK en contexte tumoral : de la dysfonction à l'exhaustion ?	55
3.2.1. Altérations de l'expression des récepteurs activateurs et inhibiteurs.....	56
3.2.2. Altérations de la différenciation et de la survie des cellules NK.....	57
3.2.3. Mécanismes impliqués dans l'altération des cellules NK en contexte tumoral...	58
3.2.4. De la dysfonction à l'exhaustion ?.....	60
4. Cellules NK et thérapies anti-tumorales	60

4.1.	Modulation <i>in vivo</i> des cellules NK	62
4.1.1.	Ciblage par des anticorps	62
	a) Anticorps agonistes et antagonistes monovalents ciblant les cellules NK ...	62
	b) Activation de l'ADCC	62
	c) Nouvelles générations : Bi-KEs, Tri-KEs et NKCE.....	63
4.1.2.	Utilisation de cytokines <i>in vivo</i>	64
4.1.3.	Ciblage du microenvironnement tumoral	65
4.2.	Manipulation <i>in vitro</i> des cellules NK.....	66
4.2.1.	Transfert adoptif de cellules NK primaires.....	66
4.2.2.	Cellules NK génétiquement modifiées	67
4.2.3.	Vers des « super » cellules NK.....	68

Chapitre 2 : L'interleukine-33, facteur nucléaire et alarmine régulatrice des réponses immunitaires.....71

I.	L'Interleukine-33, alarmine de la famille des IL-1s.....	72
1.	Du gène à la protéine	72
2.	Du facteur nucléaire à la cytokine.....	73
II.	Mécanismes de libération de l'IL-33	76
III.	L'IL-33, une protéine finement régulée	78
1.	Régulation par épissage alternatif	78
2.	Régulation à l'échelle de la protéine	79
IV.	Fonctions biologiques de l'axe IL-33/ST2	82
1.	L'IL-33 en tant que facteur nucléaire.....	82
2.	L'IL-33, une alarmine pléiotrope	83
	2.1. Expression du récepteur ST2.....	83
	2.2. Voie de signalisation en aval de ST2	85
	2.3. Activation des cellules immunitaires de type-2	87
	2.4. Régulation des cellules immunitaires de type-1	90
	2.5. Régulation des cellules NK et NKT.....	90
	2.6. Régulation des lymphocytes Th17	91
	2.7. IL-33 et lymphocytes T régulateurs.....	91
	2.8. Régulation des autres cellules immunitaires	93
	2.9. Régulation des cellules non-immunitaires	93
V.	Rôles de l'IL-33 en physiopathologie	93
1.	Pathologies non tumorales.....	93
2.	L'axe IL-33/ST2 en contexte tumoral.....	95
	2.1. Expression de l'axe IL-33/ST2 dans les tumeurs	95
	2.1.1. Expression d'IL-33 dans les tumeurs	95
	2.1.2. Expression de ST2 dans les tumeurs	97
	2.2. Régulation de la tumorigénèse et impact pronostique	97
	2.2.1. Rôle duel de l'IL-33 dans la régulation de la réponse immunitaire en contexte tumoral.....	99
	a) L'IL-33, régulatrice de l'immunité pro-tumorale	99
	b) L'IL-33, actrice de l'immunosurveillance anti-tumorale.....	100
	2.2.2. Effets de l'IL-33 sur les cellules tumorales	101
	2.2.3. Effets de l'IL-33 sur les cellules stromales.....	102
	2.2.4. Impact pronostique de l'axe IL-33/ST2 en contexte tumoral.....	103
VI.	L'IL-33 : nouvelle thérapie anti-tumorale.....	104

Hypothèse et objectifs du projet de thèse	105
Résultats	107
Discussion et perspectives	165
Partie 1 : L'IL-33, puissante activatrice d'une sous-population de cellules NK polyfonctionnelles	167
I. Spécificités de l'activation des cellules NK par l'IL-33	167
1. La synergie avec l'IL-12.....	167
1.1. Mise en évidence de la protéine ST2 sur les cellules NK humaines.....	167
1.2. Comparaison avec l'IL-18	169
2. La synergie avec d'autres cytokines	171
II. Les cellules NK ST2⁺ : identification d'une nouvelle sous-population.....	172
1. Les cellules NK CD56^{bright} ne répondent pas à l'IL-33	172
2. Profil transcriptionnel unique des cellules NK ST2⁺.....	174
2.1. Définition de la signature transcriptomique des cellules NK ST2 ⁺	174
2.2. Les cellules NK ST2 ⁺ : sous-population intermédiaire au cours de la différenciation des cellules NK CD56 ^{bright} vers CD56 ^{dim}	175
2.3. Ontogénie des cellules NK ST2 ⁺	177
2.4. Régulation de l'expression de ST2 par l'axe IL-12/STAT-4	178
2.4.1. Régulation de l'axe IL-12/STAT-4 dans les cellules NK CD56 ^{bright}	178
2.4.2. Régulation de l'axe IL-12/STAT-4 dans les cellules NK CD56 ^{dim}	179
Partie 2 : L'IL-33, actrice de l'immunité anti-tumorale	180
I. Expression nucléaire d'IL-33 en contexte tumoral : quelle relevance physiologique ?.....	180
1. Expression nucléaire d'IL-33 dans les cellules stromales	180
2. Expression nucléaire d'IL-33 dans les cellules tumorales	182
II. Libération d'IL-33 au cours de la tumorigenèse.....	183
III. L'IL-33 : actrice de l'immunosurveillance des tumeurs	185
1. L'IL-33 est associée à un bon pronostic dans le cancer du sein	185
2. Polarisation de l'IL-33 vers une activité de type-1 anti-tumorale	186
3. Source d'IL-12 en contexte tumoral	187
Partie 3 : Les cellules NK ST2⁺ : nouvelle cible thérapeutique pour le traitement des cancers ?	188
I. Identification des cellules NK ST2⁺ dans le cancer du sein	188
II. Réponse des cellules NK intra-tumorales à l'IL-33 <i>ex vivo</i>.....	189
III. Effet anti-tumoral de l'IL-33 combinée à l'IL-12 <i>in vivo</i> dans un modèle murin de cancer du sein	190
Conclusion et clôture.....	196
Bibliographie.....	195
Annexes	273

Liste des abréviations

ADCC : Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity	HBV : Hepatitis B Virus
AIC : Apoptosis Inhibitory Complex	HCV : Hepatitis C Virus
AICL : Activation-Induced C-type Lectin	HCMV : Human Cytomegalovirus
AML : Acute Myeloid Leukemia	HEV : High Endothelial Venules
AREG : Amphiréguline	HIV : Human Immunodeficiency Virus
ATAC-seq : Assay for Transposase-Accessible Chromatin sequencing	HLA : Human Leukocyte Antigen
BCR : B Cell Receptor	HSC : Hematopoietic Stem Cell
Bi-KEs : Bi-specific Killer Engagers	HSV : <i>Herpes Simplex Virus</i>
CAFs : Cancer-Associated Fibroblasts	HTFs : Human Tonsils Fibroblasts
CAR-NK cells : Chimeric Antigen Receptor NK cells	IBC : Invasive Breast Cancer
CAR-T cells : Chimeric Antigen Receptor T cells	ICP : Immune Checkpoints
CBD : Chromatin Binding Domain	IDO : Indoleamine 2,3-dioxygénase
CFP : Complement Factor P	IF : Immunofluorescence
CIML : Cytokine-Induced Memory-Like	IFN : Interféron
CLEC : C-type Lectin	Ig : Immunoglobuline
CLP : Common Lymphoid Progenitor	IHC : Immuno-Histochimie
CMH-1 : Complexe Majeur d'Histocompatibilité-1	IL : Interleukine
CMV : Cytomegalovirus	ILC : Innate Lymphoid Cells
COPD : Chronic Obstructive Pulmonary Disease	ILC1 : Innate Lymphoid Cells de groupe 1
CPAg : Cellules Présentatrices d'Antigènes	ILC2 : Innate Lymphoid Cells de groupe 2
CTLR : C-type Lectin-like Receptor	ILC3 : Innate Lymphoid Cells de groupe 3
CytoF : Cytometry by Time of Flight	ITAM : Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif
DAMPs : Danger-Associated Molecular Patterns	ITIM : Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif
DCs : Dendritic cells	ITT : Immunoreceptor Tyrosine Tail
DCIS : Ductal Carcinoma <i>In Situ</i>	KACL : Keratinocyte-Associated C-Type Lectin
DISC : Death-Inducing Signaling Complex	KIR : Killer cell Immunoglobulin-like Receptors
EMA : European Medicines Agency	KL : c-Kit Ligand
EMT : Epithelial-to-Mesenchymal Transition	KO : Knock-out
ER : Récepteur aux oestrogènes	LB : Lymphocytes B
FACS : Fluorescent-Activated Cell Sorting	LCR : Leukocyte Receptor Complex
Fas-L : Fas Ligand	LPS : Lipopolysaccharide
Fc : Fragment constant	LT : Lymphocyte T
FcR : Récepteur au fragment constant	LTh : Lymphocytes T helper
FDA : Food and Drug Administration	LTh1 : Lymphocytes T helper de type-1
FLT3L : Flt3-Ligand	LTh2 : Lymphocytes T helper de type-1
GIST : Gastro-Intestinal Stromal Tumor	LTi : Lymphoid Tissue inducer
GvHD : Graft-versus-Host Disease	MCMV : Murine Cytomegalovirus
GvL : Graft-versus-Leukemia	MDS : Myelodysplastic Syndrome
GWAS : Genome-Wide Association Study	MDSCs : Myeloid-Derived Suppressor Cells
	MPO : Myélopéroxydase
	NCR : Natural Cytotoxicity Receptors
	NK : Natural Killer
	NKAr : NK cell Activating Receptors

NKC : NK complex
NKCE : NK Cell Engagers
NKDI : Natural Killer cell Developmental Intermediates
NKT : Natural Killer T cells
NLS : Nuclear Localization Site
OLP : Organe Lymphoïde Primaire
OLS : Organe Lymphoïde Secondaire
PAMPs : Pathogen-Associated Molecular Patterns
PAR : Protease-Activated Receptors
PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cells
pDC : Cellule Dendritique plasmacytoïde
PGE2 : Prostaglandine E2
PLA2 : Phospholipase A2
PMA : Phorbol Myristate Acetate
Poly I:C : Polyinosinic:polycytidylic acid
PR : Récepteur à la progestérone
Pré-NK : Précurseurs NK
Pro-NK : Progéniteurs NK
PRR : Pattern Recognition Receptor
RNA-seq : RNA sequencing

RT-qPCR : Reverse Transcription
Quantitative Polymerase Chain Reaction

S1P5 : Sphingosine-1-phosphate receptor
5

SBR : Scarff-Bloom et Richardson

sc-ATAC-seq : single-cell Assay for
Transposase-Accessible Chromatin
sequencing

sc-RNA-seq : single-cell RNA sequencing

siRNA : small interference RNA

SLAM : Signaling Lymphocytic Activation
Molecule

TCR : T Cell Receptor

TKi : Tyrosine Kinase inhibitors

TLR : Toll-Like Receptors

TMA : Tissue Micro-Array

TRegs : Regulatory T cells

Tri-KEs : Tri-specific Killer Engagers

VAT : Visceral Adipose Tissue

VIH : Virus de l'Immunodéficience
Humaine

WT : Wild-Type

Préambule

Reconnu de manière plus tardive comme l'une des caractéristiques du cancer (« hallmarks of cancer »), le système immunitaire a une relation extrêmement complexe avec la tumeur qui évolue au cours du développement de la pathologie (Hanahan and Weinberg, 2011). Le modèle des « 3E » pour **E**limination des cellules tumorales en cours de transformation et aux stades pré-tumoraux, **E**quilibre des mécanismes mis en place par les cellules immunitaires et la tumeur dans les stades précoces, et enfin **E**chappement des cellules tumorales à la surveillance immunitaire résume de manière plutôt fidèle l'évolution des échanges entre ces deux interfaces (Dunn et al., 2004). Ainsi, les termes d'immunosurveillance et d'immuno-échappement, qui seront utilisés dans ce manuscrit, traduisent respectivement une réponse immunitaire anti-tumorale efficace lorsque la croissance tumorale est contrôlée et la perte de contrôle immunitaire lorsque la tumeur s'installe et croît. L'ensemble des cellules immunitaires, innées et adaptatives, prennent part à cette « conversation » avec la tumeur, avec certaines cellules impliquées dans l'élimination des cellules tumorales (cellules NK, lymphocytes T CD8+, lymphocytes B, cellules dendritiques) tandis que d'autres favorisent l'échappement de la tumeur (macrophages de type M2, LT régulateurs ou Tregs). Notre équipe s'intéresse à l'ensemble de ces populations immunitaires et à leur rôle précis dans l'orchestration de la réponse immunitaire en contexte tumoral. L'étude des relations entre la tumeur et le système immunitaire est un enjeu majeur aujourd'hui pour accroître notre compréhension de ces mécanismes et concevoir des thérapies innovantes. En effet, des traitements ciblant le système immunitaire pour restaurer une réponse anti-tumorale fonctionnelle ont récemment vu le jour et révolutionné le paysage thérapeutique, permettant ainsi de prolonger de manière considérable la survie de certains patients. Dans ce vaste ensemble, nous nous sommes intéressés à la relation entre les cellules Natural Killer (NK) et l'alarmine Interleukine-33 (IL-33), et à son implication dans l'immunosurveillance des cellules tumorales dans le cancer du sein. Nous avons émis l'hypothèse que la libération de l'IL-33, cytokine nucléaire de la famille IL-1, dans le microenvironnement tumoral participerait à l'activation des cellules NK au sein de la tumeur. Cette introduction a pour objectif de présenter ces deux acteurs de la réponse immunitaire et les différents concepts qui leurs sont propres pour donner les clés nécessaires à l'appréhension de nos travaux.

Introduction

Chapitre 1 : Biologie des cellules Natural Killer (NK)

I. Identification des cellules NK et généralités

Identifiées en 1975, les cellules NK ont originalement été décrites comme des cellules appartenant à la lignée lymphoïde et étant dotées d'une cytotoxicité naturelle envers les cellules tumorales (Kieśling et al., 1975). De par leur incapacité à effectuer la recombinaison homologue et l'expression de récepteurs de surface présentant une spécificité limitée, ces cellules ont historiquement été identifiées comme un lignage distinct appelé **lymphocytes innés**, et sont capables de déployer des fonctions cytotoxiques mais également sécrétrices en réponse à divers signaux activateurs. Le paysage des lymphocytes innés s'est par la suite grandement complexifié, avec la découverte d'un ensemble de cellules dites lymphoïdes innées (**ILC**), subdivisées en trois groupes contenant respectivement les **ILC1**, **ILC2** et **ILC3** (**Figure 1**). Dans cet ensemble, les cellules NK appartiennent au groupe 1 et présentent une certaine homologie avec la sous-famille des **ILC1**. Leur différenciation et maturation en cellules effectrices repose sur les facteurs de transcription **Eomes** et **T-bet** (Spits et al., 2013; Townsend et al., 2004; Pearce et al., 2003; Zhang et al., 2018). Elles jouent un rôle clé dans l'élimination des cellules infectées et des cellules dégénérantes ou en cours de transformation (**Figure 1**). Elles jouent également un rôle dans certains phénomènes physiologiques tels que la placentation ou l'immunité foetale. Historiquement, la population de cellules NK humaines est divisée en deux populations, **CD56^{bright}** et **CD56^{dim}**. Toutefois, cette dichotomie tend à se complexifier et les différents sous-types de cellules NK et leurs caractéristiques seront plus largement présentés dans la suite de ce manuscrit.

	Groupe 1		Groupe 2	Groupe 3	
	Cellules NK	ILC1	ILC2	ILC3	LTI
Facteurs de transcription	T-bet EOMES	T-bet	GATA-3	RORγT	RORγT Runx3
Cytokines activatrices	IL-12 IL-15 IL-18	IL-12 IL-18 (IL-15)	IL-33 PGD2 TSLP IL-25	IL-1β IL-2 IL-6 IL-23	IL-1β IL-2 IL-23
Molécules effectrices produites	IFN-γ Perforine Granzymes	IFN-γ	IL-4 IL-5 IL-13 IL-9 AREG	IL-17 IL-22 Lymphotoxine GM-CSF (TNF)	IL-17 IL-22 Lymphotoxine TNF RANK-L
Fonctions	Anti-virales Anti-tumorales	Immunité des muqueuses	Anti-parasitaires Réponse allergique Réparation tissulaire	Anti-bactériennes Anti-fongiques	Développement des organes lymphoïdes
Localisation	Organes lymphoïdes Sang Tissus	Intestins (MALT) Foie	Poumons Intestins Peau Tissu adipeux	Poumons Intestins Rate et thymus	Ganglions Rate

Figure 1. Les cellules lymphoïdes innées et leurs caractéristiques chez l'homme La famille des cellules lymphoïdes innées (ILC, Innate Lymphoid Cells) rassemble des cellules ayant une origine développementale et des fonctions proches impliquées dans la réponse immunitaire dite innée et dans le développement et le remodelage des tissus (lymphoïdes ou non), où elles sont particulièrement enrichies. La nomenclature actuelle les classe en 3 groupes selon les facteurs de transcription qui régulent leur développement et les cytokines qu'elles produisent. Dans cet ensemble, les cellules NK ont une certaine homologie avec le groupe des ILC1.

II. Développement des cellules NK humaines

Comme l'ensemble des cellules immunitaires, les cellules NK sont issues de la différenciation des **Cellules Souches Hématopoïétiques** (Hematopoietic Stem Cell, **HSC**) au niveau de la moelle osseuse (**Figure 2**). Ces cellules souches peuvent ensuite se différencier en **Progéniteur Lymphoïde Commun** (Common Lymphoid Progenitor, **CLP**), capable de donner naissance aux Lymphocytes T (LT), aux Lymphocytes B (LB) et aux cellules NK. Les CLP vont ainsi donner naissance aux **progéniteurs NK (pro-NK)** ou **stade 1**, de phénotype $CD34^+ CD45RA^+ CD10^+ cKit^-$ (Freud et al., 2014). L'identification dans des sites extra-médullaires de cellules ayant un phénotype proche des CLP et maintenant la capacité de se différencier en cellules NK (rate, ganglions, thymus, utérus, foie, intestins ou poumons) est en faveur d'un modèle selon lequel les précurseurs des cellules NK peuvent également émerger de la moelle osseuse de manière précoce pour ensuite se différencier en périphérie (Freud et al., 2006; Carrington and Alter, 2012; Douagi et al., 2002; Briard et al., 2002; Freud et al., 2014).

Le développement précoce des cellules NK repose largement sur l'**IL-15**, qui joue un rôle crucial dans l'initiation de leur différenciation, leur survie et leur maturation fonctionnelle (Becknell and Caligiuri, 2005). Ainsi, les souris déficientes pour la production d'IL-15 ou présentant des défauts de cette voie de signalisation manifestent une altération du compartiment de cellules NK. De manière intéressante, la déplétion des cellules myéloïdes productrices d'IL-15 diminue la survie des cellules NK et ainsi favorise le développement de métastases (Beffinger et al., 2018). A l'inverse, les souris sur-exprimant l'IL-15 de manière transgénique présentent une proportion anormalement élevée de cellules NK et développent rapidement des leucémies d'origine NK (Brandt et al., 2009; Fehniger et al., 2001). Ainsi, l'acquisition de l'expression de la chaîne B du récepteur à l'IL-15 (**CD122**) et de **cKit** (**CD117**) entraîne la différenciation des pro-NK en **précurseurs NK (pré-NK)** ou **stade 2** (Yu et al., 2013). Ces précurseurs NK sont considérés comme les premières cellules engagées dans le lignage des cellules NK *per se*, malgré l'absence de fonctions effectrices propres aux cellules NK matures. Ce stade de développement les différencie ainsi des autres cellules lymphoïdes innées (ILC1 notamment) qui ne répondent pas à l'IL-15 (Spits and Cupedo, 2012). Très proches du stade 2, les **pré-NK de stade 3** sont caractérisés par la perte d'expression de l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ et l'acquisition de l'expression du récepteur **NKR-P1A (CD161)** et de l'intégrine **LFA-1** (Yu et al., 2013). Les pré-NK de stade 2 maintiennent le potentiel à se différencier en LT ou en Cellules Dendritiques (DCs) contrairement au stade 3, en faveur d'une origine plus tardive de ces derniers (Freud et al., 2005, 2006). Le changement d'expression des intégrines à la surface de pré-NK favorise leur migration vers les Organes Lymphoïdes Secondaires (OLS), ainsi ces intermédiaires de différenciation des cellules NK (NK cell Developmental Intermediates, **NKDI**) sont majoritairement détectés en périphérie.

La perte progressive de cKit et l'acquisition de l'expression de **CD94** définissent les cellules **NK CD56^{bright}** ou **stade 4** que l'on retrouve essentiellement dans les OLS. Ce stade 4 est considéré comme le premier stade de cellules **NK matures et fonctionnelles**. Les cellules **NK CD56^{bright}** se différencient en cellules **NK CD56^{dim}** ou **stade 5** qui présentent une expression plus faible de CD56, acquièrent l'expression de **CD16** et vont quitter les OLS pour rejoindre la **circulation sanguine** (Yu et al., 2013). Par la suite, les cellules **NK CD56^{dim}** peuvent progressivement évoluer vers des cellules NK terminalement différenciées caractérisées par la perte progressive de l'expression de **CD94** parallèlement à l'acquisition de l'expression de récepteurs de la famille des **KIRs** (Killer-cell Immunoglobulin-like Receptors) et de **CD57** (Yu et al., 1998; Björkström et al., 2010). Les caractéristiques phénotypiques, fonctionnelles et la différenciation tardive des cellules NK matures **CD56^{bright}** et **CD56^{dim}** seront discutées plus précisément dans la suite de ce chapitre.

Au-delà de l'IL-15, d'autres médiateurs solubles, tels que l'IL-3, l'IL-7, les ligands des récepteurs à activité tyrosine kinase c-Kit (**c-Kit ligand; KL**) et FLT3 (**FLT3 ligand; FLT3L**) produits par les cellules stromales de la moelle osseuse essentiellement, ont un rôle de support de la différenciation des cellules NK. Ces molécules agissent en augmentant la capacité des cellules NK à répondre à l'IL-15 ou en régulant les voies anti-apoptotiques et donc la survie des pré-NK naissants (Carson et al., 1994a; Yu et al., 1998). Par opposition, le **TGF- β** peut bloquer la différenciation des cellules NK à partir des HSCs CD34⁺ (Allan et al., 2010). Par ailleurs, l'IL-1 β produite dans les OLS par les DCs peut également empêcher la maturation des cellules NK de stade 3 vers le stade 4, favorisant ainsi le maintien de cellules NK **immatures** productrices d'IL-22 et similaires à des ILC3 (Allan et al., 2010; Hughes et al., 2010).

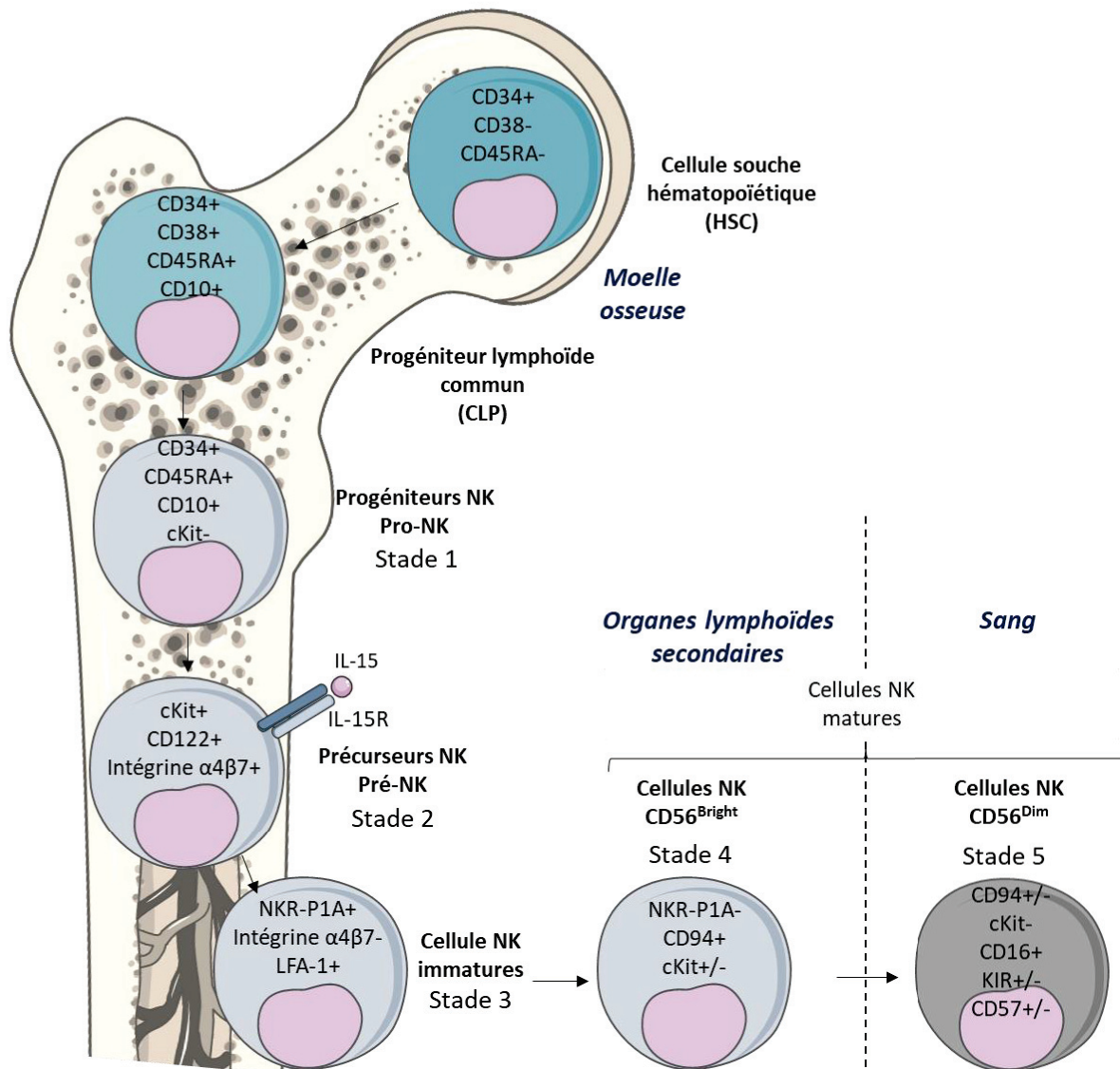


Figure 2. Développement des cellules NK humaines

Le développement précoce des cellules NK se fait dans la moelle osseuse à partir des progéniteurs lymphoïdes communs (CLP) eux-mêmes issus des cellules souches hématopoïétiques (HSC). Ces progéniteurs des cellules NK se différencient ensuite en précurseurs qui vont quitter la moelle à partir du stade 3 (cellules NK immatures) pour rejoindre les organes lymphoïdes secondaires et se différencier en cellules NK matures CD56^{bright} (stade 4). Les cellules NK CD56^{bright} sont fonctionnelles et peuvent elles-mêmes se différencier en cellules NK CD56^{dim}, particulièrement enrichies dans le sang.

La diversité du compartiment des cellules NK est largement façonnée par le contexte immunitaire dans lequel elles se développent : on parle ainsi d'**éducation** ou de « **licensing** ». En effet, l'interaction récurrente entre le CMH-1 et les récepteurs inhibiteurs nouvellement exprimés permet d'une part de maintenir la tolérance envers les cellules présentant le même haplotype mais également d'augmenter la fonctionnalité des cellules NK en les préparant à répondre à l'engagement de leurs récepteurs activateurs (Yokoyama and Kim, 2006; Anfossi et al., 2006; Yu et al., 2007a). Ce phénomène d'éducation peut avoir lieu au cours de la différenciation précoce au niveau de la moelle mais également tout au long de la différenciation tardive, selon les stimuli environnementaux rencontrés par les cellules (Elliott and Yokoyama, 2011; Chalifour et al., 2009; Raulet and Vance, 2006; Brodin et al., 2009).

III. Localisation des cellules NK

En accord avec leur rôle dans la surveillance immunitaire, il est désormais largement accepté que les cellules NK infiltrent de nombreux organes lymphoïdes et non lymphoïdes en contexte physiologique comme pathologique (Briard et al., 2002; Douagi et al., 2002; Freud et al., 2006). La fréquence des cellules NK chez l'Homme est bien supérieure dans les organes non lymphoïdes (poumon, foie) que dans les Organes Lymphoïdes Primaires (**OLP**) et secondaires : sang, rate, moelle osseuse, ganglions lymphatiques et thymus dans l'ordre décroissant (Grégoire et al., 2007). Leur présence dans les tissus peut se faire par recrutement de cellules NK matures circulantes mais également par différenciation locale de pré-NK immatures migrant dans les tissus dès les stades précoces de différenciation (Shi et al., 2011). La mobilisation des cellules NK dans les tissus lymphoïdes et non lymphoïdes est assurée par l'expression d'un large panel de récepteurs aux chimiokines et de molécules d'adhésion, dont l'expression peut être constitutive ou variable au cours de la différenciation, expliquant ainsi le tropisme de certaines sous-populations pour un tissu ou un organe particulier. Ainsi, au cours de la différenciation, l'acquisition progressive du récepteur au shingosine-1 phosphate (Sphingosine-1-phosphate receptor 5, **S1P5**) permettrait la sortie des cellules NK immatures de la moelle vers les OLS, site de maturation terminale de ces dernières. Le récepteur **S1P5** est également impliqué dans la circulation des cellules NK depuis les OLS vers le sang et les tissus à l'état d'homéostasie et en condition inflammatoire (Walzer et al., 2007). Par ailleurs, l'expression accrue de **CCR7** et de la **L-sélectine** sur les cellules NK **CD56^{bright}** assure leur localisation préférentielle au niveau des **OLS**. Au contraire, la perte de ces molécules sur les cellules NK **CD56^{dim}**, concomitante avec l'acquisition de récepteurs aux chimiokines tels que **CX3CR1**, **CXCR6** ou **CCR2** et de molécules d'adhésion telles que les **intégrines CD49b** ou **CD11b** favorise leur migration vers les tissus périphériques. **CCR5** et **CXCR3** sont quant à eux enrichis sur les cellules NK **résidentes** des tissus, qu'elles soient **CD56^{bright}** ou **CD56^{dim}**, et permettent la migration des cellules NK des OLS vers les tissus inflammés (Martín-Fontecha et al., 2004). De manière intéressante, **CCR7** peut être acquis sur les cellules NK **CD56^{dim}** périphériques en contexte inflammatoire, permettant ainsi leur re-localisation vers les ganglions lymphatiques où elles vont soutenir la différenciation des LT helper de type-1 (**LTh1**) (Mailliard et al., 2005; Pesce et al., 2017).

En contexte physiologique, des cellules **NK résidentes** ont été observées dans le **foie**, les **poumons**, la **muqueuse intestinale**, le **derme** ou encore l'**utérus**, où elles assurent des fonctions d'homéostasie, telles que la surveillance immunitaire et le maintien de la tolérance face aux agents pathogènes ou commensaux; ou la placentation et la tolérance fœtale au niveau de l'utérus. La proportion de cellules NK résidentes varie selon l'organe considéré. En effet, elles sont peu nombreuses et particulièrement difficiles à distinguer des ILC3 au niveau des muqueuses associées aux intestins, mais peuvent représenter jusqu'à 10% à 50% des lymphocytes totaux dans les poumons ou le foie respectivement (Krueger et al., 2011; Grégoire et al., 2007; Reynders et al., 2011; Ebert et al., 2006; Moffett and Loke, 2006). En contexte inflammatoire, l'infiltration de cellules NK est fortement augmentée (McIntyre and Welsh, 1986; Salazar-Mather et al., 1998) et a été observée dans des organes où elles sont normalement absentes, tels que le **pancréas** (Poirot et al., 2004; Brauner et al., 2010), les **articulations** (Tak et al., 1994; Söderström et al., 2010) ou encore le **système nerveux central** (Trifilo et al., 2004; Alsharifi et al., 2006; Alizadeh et al., 2010). Ceci suggère un lien étroit entre l'infiltration des cellules NK et l'évolution des pathologies inflammatoires, les deux phénomènes se régulant mutuellement.

Le microenvironnement unique défini par le type de cellules constituant chaque organe ainsi que les médiateurs solubles qu'elles produisent influence largement la fréquence et les caractéristiques des cellules NK résidentes (Shi et al., 2011). Cette notion est qualifiée de « **tissue imprinting** » ou empreinte tissulaire. Ainsi, de nombreuses différences phénotypiques et fonctionnelles existent entre cellules NK circulantes et résidentes, mais également entre cellules NK résidant dans des tissus différents (Freud et al., 2017; Crinier et al., 2018; Dogra et al., 2020). Les fonctions assurées par les cellules NK sont extrêmement diverses selon leur localisation et leur impact clinique varie selon l'organe et la pathologie considérée. La diversité des cellules NK ainsi que la localisation et les fonctions préférentiellement associées à chaque sous-population seront plus largement discutés dans la suite de ce chapitre.

IV. Activation et régulation fonctionnelle des cellules NK

En raison de leurs fonctions effectrices puissantes, de nombreux mécanismes de contrôle ont été sélectionnés au cours de l'évolution afin de permettre l'activation des cellules NK tout en limitant les dommages cellulaires et tissulaires liés à une activité erratique. Ainsi, l'activation des cellules NK repose essentiellement sur un **équilibre dynamique entre l'engagement de récepteurs activateurs et inhibiteurs** et la présence de nombreuses cytokines pro-inflammatoires (**IL-2, IL-15, IL-12, IL-18, TNF- α , IL-21** et **IFN- α/β**).

D'autres signaux peuvent moduler le niveau d'activation des cellules NK et proviennent de molécules de co-stimulation (**2B4, CD28, CD27, ICOS**), des points de contrôle de la réponse immunitaire (**TIM-3, TIGIT, CD96, LAG-3, KLRG1, PD-1**) ou des molécules d'adhérence (**LFA-1, ICAM-1, L-sélectine**).

L'ensemble de ces signaux sont rencontrés essentiellement au niveau des ganglions mais l'activation des cellules NK peut également se faire en périphérie au niveau des tissus.

Contrairement aux LT et LB, les cellules NK n'ont pas besoin de la reconnaissance d'un antigène spécifique pour activer leurs fonctions effectrices. Ainsi, elles peuvent s'activer dans trois contextes : la perte d'expression du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (**CMH**)-1 (« **missing-self** »), l'induction de

l'expression de protéines du soi en cas de stress cellulaire (« **induced-self** ») ou l'expression de protéines du non-soi présentes en cas d'infection ou de greffes allogéniques (« **non-self** ») (**figure 3**). Elles sont capables de sonder l'environnement grâce à un ensemble de récepteurs présentés dans le paragraphe suivant et illustrés par les **figures 4 et 5**.

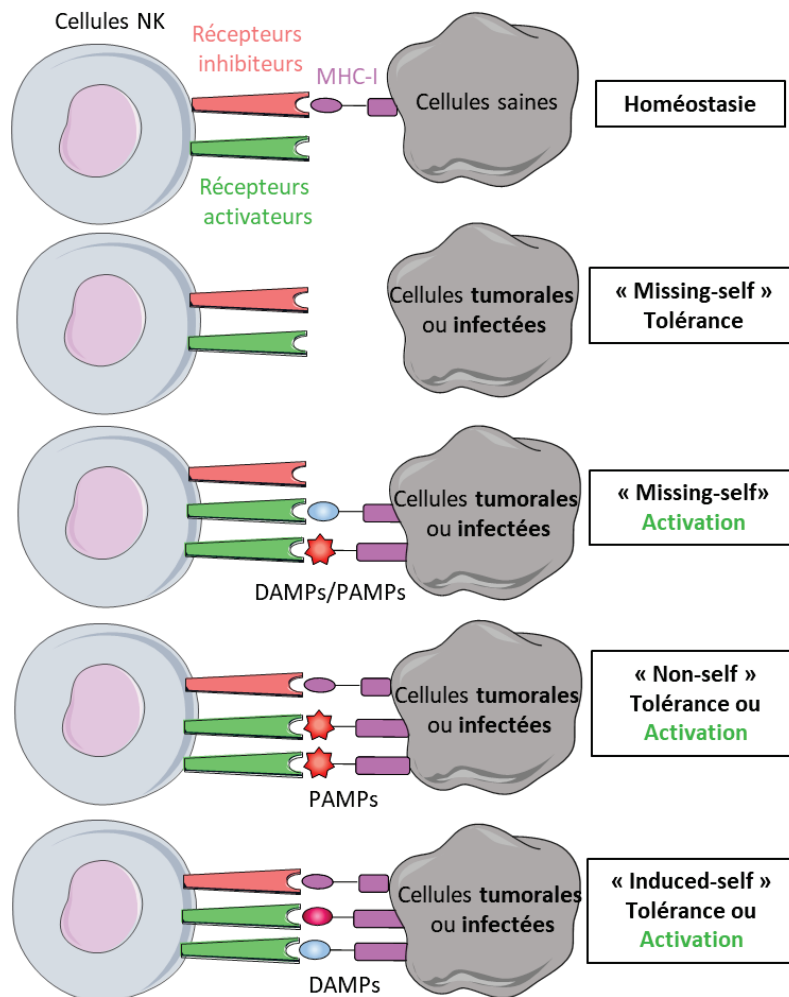


Figure 3. Modèles d'activation des cellules NK

L'activation des cellules NK repose sur la notion d'équilibre entre signaux activateurs et signaux inhibiteurs. Trois situations principales vont conduire à un déséquilibre en faveur de leur activation : l'absence de signaux inhibiteurs provenant des molécules du CMH-1 (« missing-self »), la présence de signaux activateurs provenant de peptides exogènes (issus de pathogènes généralement, « non-self ») ou endogènes (expression erratique de protéines endogènes, « induced-self »). L'absence de peptides du soi n'induit pas systématiquement un déséquilibre suffisant pour activer les cellules NK, on parle ainsi de tolérance. De même, en présence de signaux activateurs faibles, les signaux inhibiteurs peuvent empêcher l'activation des cellules NK. DAMPs : Danger-Associated Molecular Patterns, PAMPs : Pathogen-Associated Molecular Patterns.

1. Equilibre entre récepteurs inhibiteurs et activateurs

Contrairement aux autres lymphocytes qui reconnaissent une grande diversité d'antigène via un récepteur unique (*i.e.* TCR ou BCR), les cellules NK expriment à leur surface une très grande diversité de récepteurs qui leurs sont propres et qui reconnaissent chacun un nombre restreint de molécules. Ces récepteurs peuvent être classés en deux grandes familles. D'une part les récepteurs de la famille « **Immunoglobulin-like** » (Ig-like) sont codés par le complexe **LRC** (Leukocyte Receptor Complex) sur le chromosome 19 (chez l'homme) et correspondent aux sous-familles des **KIRs**, des **LIRs** (Leukocyte Immunoglobulin-like Receptors) ou encore des **NCR** (Natural Cytotoxicity Receptors). D'autre part, les récepteurs de la famille des **CTLR** (C-Type Lectin-like Receptors) sont codés par le complexe **NKC** (Natural Killer gene Complex) sur le chromosome 12 (chez l'homme). Cette famille regroupe les récepteurs de type « **NKG2** », à l'exception du récepteur NKG2D, qui s'associe généralement sous forme d'hétérodimères avec la protéine **CD94** responsable de la transduction d'un signal activateur ou inhibiteur selon le récepteur avec lequel elle se dimérise. Enfin, cette famille regroupe également les récepteurs **NKR-P1A**, **NKp65** et **NKp80** qui reconnaissent des molécules de la famille des lectines.

Contrairement au TCR et au BCR des LT et LB respectivement, les récepteurs spécifiques des cellules NK peuvent transmettre un signal activateur ou inhibiteur selon les récepteurs engagés. Les récepteurs de la famille des KIRs sont également exprimés par les LT CD4⁺, les LT CD8⁺ cytotoxiques et les lymphocytes de type $\gamma\delta$ (van Bergen et al., 2009; Björkström et al., 2012; Battistini et al., 1997), tandis que les récepteurs de la famille des LIR sont partagés avec les lymphocytes B (Kang et al., 2015). Enfin, d'autres récepteurs, non spécifiques des cellules NK, régulent également leur activation.

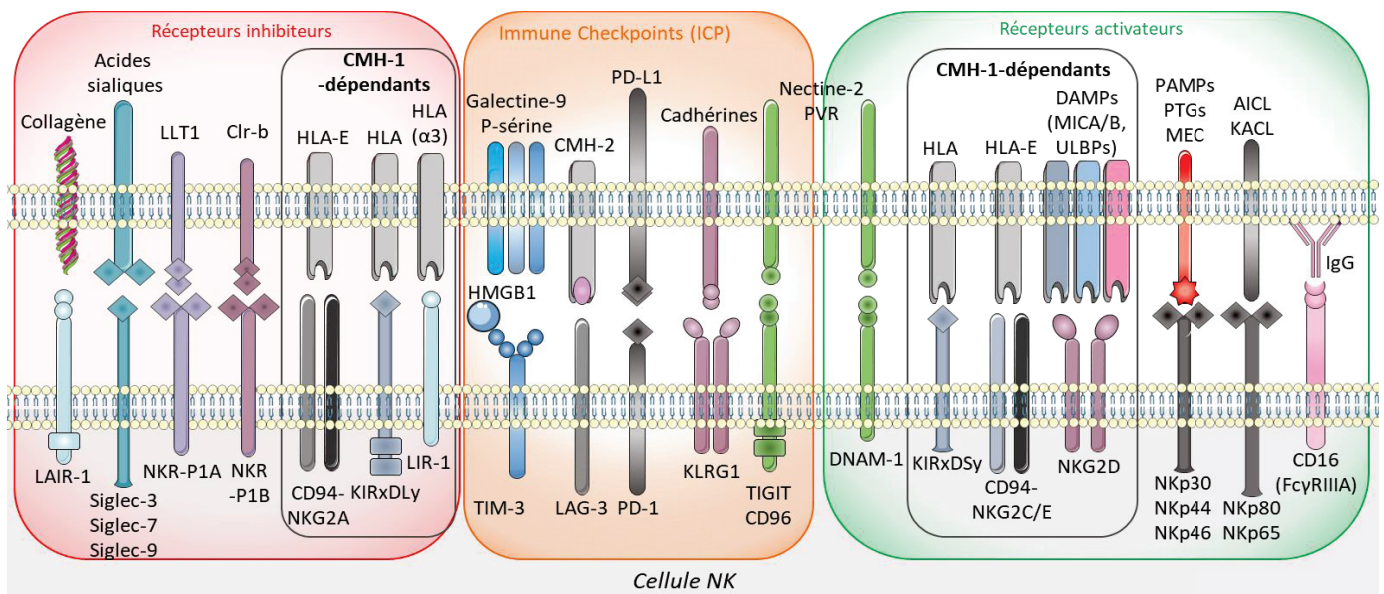


Figure 4. Récepteurs inhibiteurs, activateurs et immune checkpoints exprimés à la surface des cellules NK et leurs ligands

L'activation des cellules NK repose sur un équilibre entre récepteurs inhibiteurs et activateurs qui reconnaissent les protéines polymorphes du CMH-1 et des molécules exprimées à la surface des cellules de manière constitutive ou induites par la présence d'un pathogène ou par la transformation (DAMPs). Certains récepteurs activateurs (NKp30, NKp44, NKp46) reconnaissent directement des protéines issues de pathogènes (PAMPs). L'expression de ces récepteurs peut varier en fonction du stade de développement, de la localisation des cellules mais également d'un individu à un autre selon le patrimoine génétique ou l'histoire infectieuse. DAMPs : Danger-Associated Molecular Patterns, MEC : Matrice Extra Cellulaire, ICP : Immune CheckPoints, MEC : Matrice Extracellulaire, PAMPs : Pathogen-Associated Molecular Pattern, PTGs : Protéoglycane.

1.1. Récepteurs inhibiteurs

L'observation, en 1986, que la lignée tumorale **RMA-S** déficiente pour l'expression du CMH-1 est efficacement rejetée par les cellules NK *in vivo*, a suggéré très tôt l'existence de récepteurs inhibiteurs capables de reconnaître les molécules de CMH-1 (Kärre et al., 1986).

En effet, ces récepteurs inhibiteurs agissent comme un frein limitant l'activation des cellules NK contre des antigènes du soi. Ils appartiennent à différentes familles mais ont en commun la présence d'un motif **ITIM** (Immunoreceptor Tyrosin-based Inhibition Motif) dans leur partie intracellulaire, permettant ainsi le recrutement des phosphatases **SHP-1** ou **SHP-2** pour transmettre un signal inhibiteur. Ces récepteurs interagissent avec les complexe **CMH-1/peptide** présentant des **peptides du soi** ou avec d'autres protéines exprimées à la surface des cellules (**collagène, cadhérines, acides sialiques, léctines**) à l'état d'homéostasie (Bléry et al., 2000).

Les récepteurs de la famille des **KIRs** chez l'Homme et **Ly49** (Lymphocyte Antigen 49) chez la souris sont hautement polymorphes et reconnaissent ainsi un panel de molécules du **CMH-1**. En effet, chaque gène présente plusieurs allèles qui peuvent être différenciellement exprimés d'un individu à un autre, définissant ainsi un **haplotype** KIR qui dicte la tolérance des cellules NK envers le répertoire **HLA** propre à chaque individu. Par ailleurs, chez un même individu, chaque cellule NK exprime seulement une fraction des KIRs, définissant ainsi des sous-populations capables de reconnaître des signaux différents. Très brièvement, les **KIRs inhibiteurs** sont nommés KIRxDLy, avec « x » représentant le nombre de domaines Ig-like extracellulaires, « L » indiquant un domaine intracytoplasmique long et donc inhibiteur et « y » étant le numéro d'identification du gène KIR (Middleton and Gonzelez, 2010).

Le récepteur **LIR-1** quant à lui appartient à la famille des **LIRs** et interagit avec une multitude de molécules du CMH-1 en reconnaissant leur domaine **α3** peu polymorphique. Par ailleurs, **LIR-1** est également directement engagé par la protéine **UL18**, homologue du CMH-1 exprimée par le virus MCMV, constituant ainsi un mécanisme d'échappement du virus à la surveillance immunitaire médiée par les cellules NK (Chapman et al., 1999).

Parmi les récepteurs inhibiteurs codés par le complexe NKC, on retrouve l'hétérodimère **NKG2A/CD94** qui reconnaît le complexe **HLA-E**, protéine non conventionnelle et peu polymorphe du CMH-1 chez l'homme, ou Qa-1 chez la souris (Borrego et al., 1998; Vance et al., 1998). Dans la même famille, **NKR-P1A** reconnaît la lectine **LLT1** exprimée sur les LT, les LB, les cellules NK elles-mêmes ou les ostéoclastes (Rosen et al., 2005; Boles et al., 1999; Hu et al., 2004; Llibre et al., 2016). **NKR-P1A** est exprimé à la surface des cellules NK immatures ou activées par l'IL-12 (Bennett et al., 1996; Poggi et al., 1998). Le récepteur inhibiteur **NKR-P1B** quant à lui interagit avec la protéine **Clr-b** exprimée à la surface des cellules saines dans virtuellement tous les tissus à l'exception du cerveau (Balaji et al., 2018).

En conclusion, les récepteurs inhibiteurs ont pour rôle de limiter l'auto-réactivité des cellules NK tout en assurant une détection des cellules anormales. En accord avec cette idée, les KIRs inhibiteurs montrent une corrélation positive avec l'expression de leur ligand, tandis que l'inverse a été observé pour les KIRs activateurs (Single et al., 2007). Ces interactions constituent une cible majeure d'échappement à la détection par les cellules NK en contexte viral ou tumoral et certains de ces mécanismes seront détaillés dans la partie traitant du rôle des cellules NK en contexte tumoral.

1.2. Récepteurs activateurs

Par opposition, les récepteurs activateurs présentent généralement une partie intracellulaire plus courte, caractérisée par un domaine **ITAM** (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) présent sur le récepteur lui-même ou sur des adaptateurs qui leur sont associés (**DAP-10**, **DAP-12** ou **CD3- ζ**). Ce motif ITAM permet le recrutement des kinases **Syk** ou **ZAP70**, nécessaires à la transmission d'un signal activateur pour induire les fonctions sécrétrices et cytotoxiques des cellules NK. Ces récepteurs activateurs ont un effet cumulatif lorsque plusieurs d'entre eux sont activés de manière concomitante (Bryceson et al., 2006). Ils reconnaissent des molécules du **CMH-1** mais également des protéines d'origine virale (Pathogen-Associated Molecular Patterns ou **PAMPs**) ou l'expression de certaines protéines associées à un stress ou à la transformation (Danger Associated Molecular Patterns ou **DAMPs**).

Parmi les récepteurs activateurs, on retrouve des récepteurs de la famille des **KIRs/Ly49**. Contrairement à leurs homologues inhibiteurs, ces KIRs sont caractérisés par un domaine intracytoplasmique court, et sont donc référencés en tant que KIRxDSy, avec « S » signifiant « short » (Middleton and Gonzelez, 2010). Les ligands des récepteurs KIRs activateurs demeurent largement non identifiés à ce jour. Toutefois, l'homologie de leur domaine extracellulaire avec celui des KIRs inhibiteurs suggère qu'ils reconnaissent également des molécules du CMH-1 permettant ainsi la reconnaissance de cellules cibles exprimant un haplotype différent (Moretta et al., 1995; Stewart et al., 2005; Chewning et al., 2007). De manière intéressante, les KIRs activateurs présentent systématiquement une avidité plus faible pour les molécules du CMH-1 que les KIRs inhibiteurs, limitant ainsi l'auto-réactivité des cellules NK (Stewart et al., 2005).

Par ailleurs, la famille des récepteurs **NCRs** regroupe les récepteurs **NKp30**, **NKp46** et **NKp44**. Les deux premiers sont exprimés de manière constitutive sur quasiment toutes les cellules NK, tandis que NKp44 est induit après activation, par l'IL-12 par exemple (Pende et al., 1999; Sivori et al., 1997; Vitale et al., 1998). **NKp30** reconnaît les molécules **B7-H6** et **Bat-3 (BAG6)**, exprimées par les cellules tumorales, tandis que **NKp44** et **NKp46** reconnaissent directement des **hémagglutinines virales** (Brandt et al., 2009; Pogge von Strandmann et al., 2007; Arnon et al., 2001; Mandelboim et al., 2001; Jarahian et al., 2009). NKp46 reconnaît également d'autres ligands issus de parasites et de bactéries (Kruse et al., 2014; Vitenshtein et al., 2016; Chaushu et al., 2012). Toutefois, les NCRs sont également capables de reconnaître des molécules exprimées à la surface des cellules à l'état d'homéostasie telles que des **protéoglycanes** (héparanes sulfates, héparanase, glypican-1), des **protéines de la matrice extracellulaire** (Nidogen-1) ou encore la **vimentine** (Bloushtain et al., 2004; Zilka et al., 2005; Garg et al., 2006; Barrow et al., 2019). NKp46 est également capable d'interagir avec la **protéine P du système du complément (CFP, properdin)** produite par les leucocytes et participant à l'activation de la voie alternative du complément (Narni-Mancinelli et al., 2017). En outre, la protéine **pp65** du CMV est capable d'interagir avec **NKp30**, inhibant ainsi son activité en provoquant sa dissociation de la protéine CD3- ζ (Arnon et al., 2005). Parmi les récepteurs activateurs codés par le complexe NKC, on retrouve les récepteurs **NKG2C**, **NKG2D**, **NKG2E**, **NKp65** et **NKp80**. Les récepteurs activateurs de type « NKG2 » se divisent en deux catégories : les récepteurs **NKG2C** et **NKG2E** qui s'associent sous forme d'hétérodimère avec **CD94** et recrutent l'adaptateur **DAP-12** d'une part ; et le récepteur **NKG2D** qui s'homodimérise et recrute l'adaptateur **DAP-10** d'autre part. **NKG2C** et **NKG2E** reconnaissent le complexe **HLA-E** peu polymorphique (Houchins et al., 1997; Lanier et al., 1998; Orbelyan et al., 2014; Wu et al., 1999). **NKG2D** quant à lui reconnaît essentiellement des ligands cellulaires tels que les protéines polymorphiques **MICA**, **MICB** ou les protéines de la famille des **ULBPs** regroupant 6 isoformes chez l'homme (ULBP1-6) ; et les famille des protéines **RAE-1** (RAE1 α , β , γ , et δ), **H60** (H60a, b et c) et la protéine **MULT-1** chez la souris (Bauer et al., 1999; Cosman et al., 2001; Cerwenka et al., 2000; Carayannopoulos et al., 2002; Diefenbach et al., 2003). Ces ligands partagent une certaine

homologie avec les protéines du CMH-1 mais sont peu présents à la surface des cellules à l'état basal et leur expression est fortement augmentée à la surface des cellules infectées ou transformées (Groh et al., 2001; Tieng et al., 2002; Groh et al., 1999; Diefenbach et al., 2000). Par ailleurs, **NKp80** et **NKp65** reconnaissent un ensemble de **lectines** de la famille CLEC (C-type Lectin-like) telles que **AICL** (Activation-Induced C-type Lectin) exprimée sur les monocytes activés et certaines lignées myéloïdes transformées pour **NKp80** (Vitale et al., 2001; Welte et al., 2006) ou **KACL** (Keratinocyte-Associated C-Type Lectin) exprimée spécifiquement et de manière constitutive sur les kératinocytes pour **NKp65** (Spreu et al., 2010). L'expression constitutive de KACL par les kératinocytes et de NKp65 par les cellules NK suggère un rôle de l'axe NKp65/KACL dans la surveillance immunitaire de la peau. Toutefois, cette question demeure à ce jour non élucidée.

Le récepteur **DNAM-1 (CD226)** exprime un motif **ITT** (Immunoreceptor Tail Tyrosine), légèrement différent du motif **ITAM**, mais induisant également des voies de signalisation activatrices des cellules NK.

Enfin, le récepteur activateur **CD16 (FcγRIII)** tient sa particularité dans sa capacité à reconnaître le fragment constant des **Ig de classe G (IgG)** fixées à la surface d'une cellule suite à l'opsonisation et joue ainsi un rôle dans la lyse dite dépendante des anticorps (Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity, **ADCC**). Ce mécanisme sera plus largement abordé dans la partie abordant les fonctions effectrices des cellules NK.

De manière intéressante, au sein du locus **NKC**, la proximité directe entre les gènes codant les récepteurs et leurs ligands respectifs peut induire leur expression concomitante, régulant ainsi la réponse des cellules NK de manière intrinsèque. Par exemple, il a été démontré que la protéine **AICL**, ligand de **NKp80**, peut être stockée dans le cytoplasme des cellules NK et adressée à leur surface en réponse à une activation par des cytokines pour activer les cellules NK, de manière **homotypique** et **hétérotypique**. Dans le cas d'une activation **hétérotypique**, ce mécanisme peut induire un phénomène **fratricide** entre cellules NK leur conférant ainsi un rôle régulateur (Klimosch et al., 2013). Toutefois, ce phénomène peut être contrebalancé par l'augmentation de l'expression de **LLT1**, ligand du récepteur inhibiteur **NKR-P1A**, à la surface des cellules NK activées (Poggi et al., 1998). Ainsi, de manière générale, la notion d'**équilibre** est primordiale dans la régulation de l'activation des cellules NK. L'engagement des récepteurs inhibiteurs ne suffit pas à empêcher l'activation de la cellule lorsque les signaux activateurs sont trop puissants. La théorie du « missing-self » n'est donc pas forcément un prérequis à l'activation. Enfin, en présence de signaux inhibiteurs et activateurs, l'état de tolérance semble être favorisé étant donné que les signaux inhibiteurs peuvent directement inhiber les protéines de la voie de signalisation activatrice (Stebbins et al., 2003; Peterson and Long, 2008; Liu et al., 2012).

1.3. Immune checkpoints régulateurs

Un ensemble de récepteurs initialement identifiés comme « points de contrôles » inhibiteurs de la réponse immunitaire des LT (Immune Checkpoints, ICP) tels que **KLRG1**, **TIGIT**, **CD96 (TACTILE)**, **TIM-3** ou de manière plus controversée **PD-1**, peuvent également être exprimés par les cellules NK en contexte tumoral ou infectieux et vont limiter l'activation des cellules NK. Ces récepteurs reconnaissent des molécules qui n'appartiennent pas au CMH-1 et qui peuvent être exprimées à la surface des cellules à l'état d'homéostasie ou suite à une réponse immunitaire et à la transformation des cellules. L'expression de ces ICP est généralement acquise suite à l'activation des cellules NK et est donc étroitement liée avec la notion d'épuisement des cellules NK qui sera abordée dans la suite de ce manuscrit.

Ainsi, le récepteur **KLRG1** est exprimé par les cellules NK suite à leur maturation et prolifération et interagit avec les **cadhérines E, N et R** participant ainsi à la tolérance envers les cellules exprimant ces molécules à l'état d'homéostasie mais également à l'élimination des cellules tumorales caractérisées par une diminution d'expression de la cadhérine E (Huntington et al., 2007; Robbins et al., 2002; Akatsuka et al., 2010; Takeichi, 1993; Birchmeier et al., 1993). De même, les récepteurs **Siglec-7, Siglec-9 et Siglec-3**, exprimées sur la totalité (Siglec-7) ou sur une partie des cellules NK activées (Siglec-9 et Siglec-3), reconnaissent les **acides sialiques** exprimés à la surface des cellules (Nicoll et al., 1999; Belisle et al., 2010; Hernández-Caselles et al., 2006). Le récepteur **LAIR-1**, appartenant à la famille des LIRs, est quant à lui exprimé sur la quasi-totalité des cellules NK interagit avec le **collagène** identifiant ainsi la matrice extracellulaire et ses composants comme acteurs de la régulation des cellules NK (Lebbink et al., 2006).

TIGIT et **CD96** reconnaissent des ligands de la famille des **nectines** tels que **PVR (CD155)** et **nectin-2 (CD112)** exprimés sur les cellules présentatrices d'antigènes (**CPAg**), les lymphocytes T activés ou sur les cellules en conditions de stress ou de transformation (Stanietsky et al., 2009; Levin et al., 2011; Casado et al., 2009; Chan et al., 2014). De manière intéressante, **TIGIT** et **CD96** reconnaissent les mêmes ligands que **DNAM-1**, soit **PVR (CD155)** et **Nectin-2 (CD112)**, entrant ainsi directement en compétition avec ces récepteurs inhibiteurs (Bottino et al., 2003; Chan et al., 2014).

TIM-3 se lie quant à lui avec diverses molécules telles que la **galectine-9** (Zhu et al., 2005), la **phosphatidyl-sérine** (Nakayama et al., 2009), l'alarmine **HMGB1** (Chiba et al., 2012) respectivement exprimées sur les cellules tumorales, les cellules apoptotiques ou relarguée en cas de stress cellulaire. **TIM-3** peut également interagir avec **CEACAM1** exprimée sur les LT activés (Huang et al., 2015).

Enfin, l'expression de **PD-1** a également été rapportée à la surface des cellules NK en contexte tumoral (Benson et al., 2010; Beldi-Ferchiou et al., 2016) ou d'infection chronique (Norris et al., 2012) et va limiter l'activation des cellules NK en interagissant avec son ligand **PD-L1** exprimé sur certaines cellules tumorales. Toutefois, l'expression de **PD-1** par les cellules NK reste à ce jour très controversée et serait relativement faible par rapport à l'expression sur les lymphocytes T CD8+ et par rapport à l'expression d'autres ICP tels que **CD96, TIM-3, LAG-3** ou encore **TIGIT** (Judge et al., 2020; Zhang et al., 2018b).

1.4. Rôle des molécules de co-stimulation et d'adhérence

Tout comme les LT, les cellules NK expriment un ensemble de molécules dites de co-stimulation qui régulent leur activation (**Figure 5**). Ainsi, elles expriment **CD27** et **CD28** de manière constitutive et acquièrent l'expression d'**ICOS** suite à leur activation (Takeda et al., 2000; Azuma et al., 1992; Ogasawara et al., 2002; Brady et al., 2004; Carbone et al., 1997).

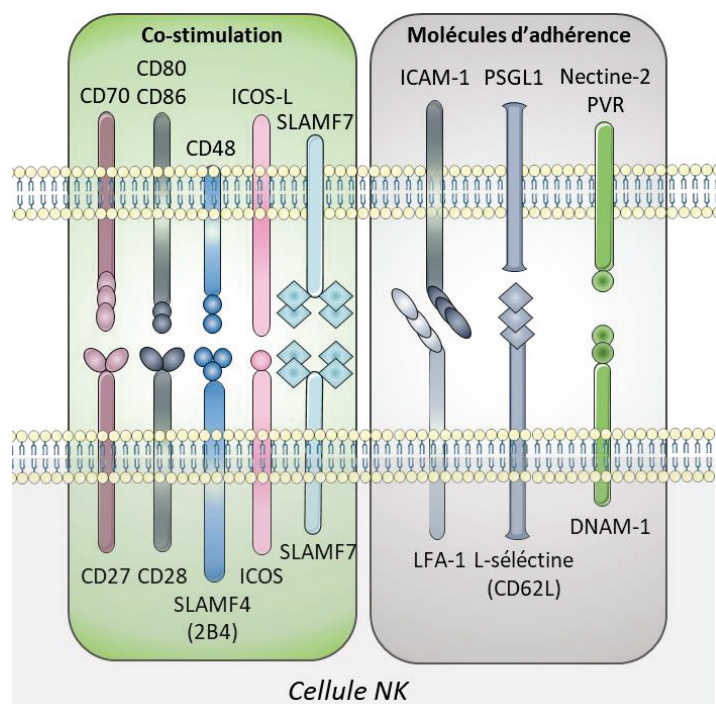


Figure 5. Molécules de co-stimulations et d'adhérence exprimées à la surface des cellules NK et leurs ligands

Les cellules NK expriment également à leur surface des molécules de co-stimulation et d'adhérence qui vont potentialiser leur activation. Les molécules de co-stimulation vont activer des voies de signalisation activatrices tandis que les molécules d'adhérence vont favoriser l'interaction des cellules NK avec leur cible.

Par ailleurs, elles expriment des récepteurs co-stimulateurs de la famille des **SLAM** (Signaling Lymphocytic Activation Molecule) tels que **SLAMF4** (autrement appelé **2B4**) et **SLAMF7**. **SLAMF4 (2B4)** transmet un signal activateur en interagissant avec la molécule **CD48** exprimée sur les cellules hématopoétiques dont l'expression est augmentée en conditions inflammatoires (Eissmann et al., 2005). Le récepteur **SLAMF7** quant à lui active les fonctions effectrices des cellules NK suite à des interactions **homotypiques**, c'est-à-dire avec d'autres cellules exprimant SLAMF7, telles que les LT et LB activés ou encore les cellules transformées (Pazina et al., 2017). Ce récepteur joue donc un rôle dans la détection et l'élimination des cellules tumorales par les cellules NK mais participe également à l'activation d'autres cellules immunitaires. Les récepteurs de la famille des SLAM participent également à la régulation de l'adhérence des cellules NK en augmentant l'avidité de molécules telles que **LFA-1** par exemple (Urlaub et al., 2017).

En effet, indirectement, les molécules d'adhérence exprimées à la surface des cellules NK régulent également leur activation. Ainsi, l'expression de **LFA-1** ou **ICAM-1** permet de stabiliser la synapse immunitaire, facilitant ainsi la lyse de la cellule cible (Chong et al., 1994; Barber et al., 2004; Urlaub et al., 2017). Par ailleurs, en plus de la régulation de l'activité des cellules NK, **DNAM-1** régule également leur adhérence (Shibuya et al., 1996) (**Figure 5**).

A l'exception de **CD28** lorsqu'elle interagit avec **CTLA-4**, l'interaction de ces molécules avec leurs partenaires respectifs a pour effet de stimuler les fonctions effectrices des cellules NK.

2. Rôle des cytokines

Les cellules NK expriment également de manière constitutive un ensemble de récepteurs aux cytokines telles que l'**IL-15**, l'**IL-2**, l'**IL-21**, l'**IL-12**, l'**IL-27**, l'**IL-18**, les **IL-1s**, les **interférons (IFN)**, l'**IL-10** ou le **TGF-β**. Leur activation est donc également contrôlée par la présence de ces médiateurs solubles dans leur environnement. L'ensemble de ces cytokines, leurs récepteurs et leurs voies de signalisation sont présentés dans la **figure 6**.

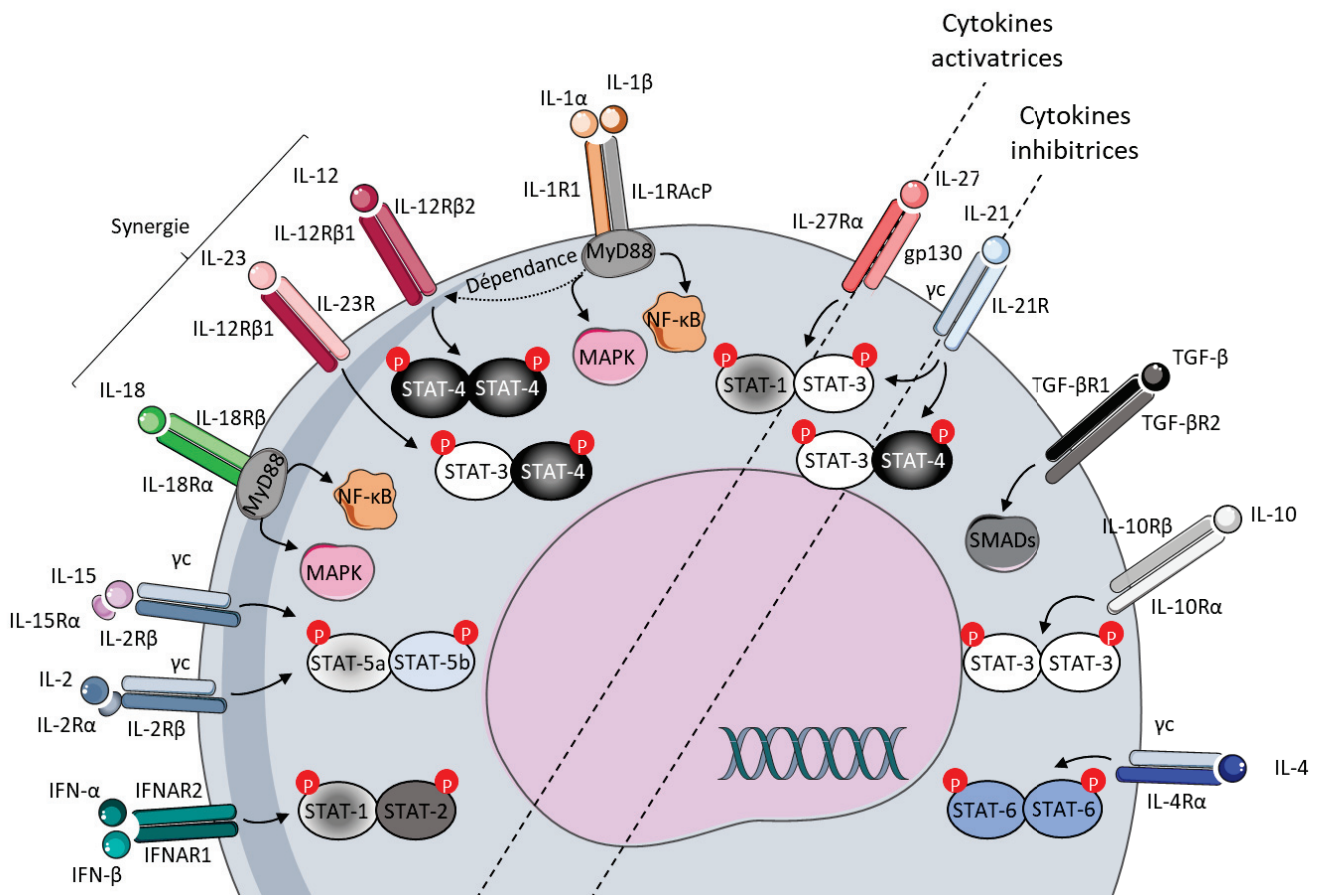


Figure 6. Cytokines, récepteurs et voies de signalisation régulant les fonctions des cellules NK

De nombreuses cytokines, appartenant à des familles distinctes, régulent finement l'activité des cellules NK. Elles peuvent transmettre des signaux activateurs, inhibiteurs ou qui peuvent varier selon le contexte. Elles sont majoritairement produites par les autres cellules immunitaires ou les cellules NK elles-mêmes et peuvent agir en synergie (IL-12 avec IL-18 et IL-23), de manière interdépendante (IL-1α et IL-1β par rapport à l'IL-12) ou en opposition (IL-10 et TGF-β peuvent antagoniser l'action des cytokines activatrices). Certaines de ces cytokines activent les voies STATs (IFN-α, IL-2, IL-15, IL-23, IL-12, IL-27, IL-21, IL-10 ou IL-4). Les cytokines de la famille des IL-1s recrutent l'adaptateur MyD88 pour activer les voies des MAPKineses (MAPK) et NF-κB. Le TGF-β active la voie des protéines SMADs.

Les cytokines de la **famille γ** , comme l'IL-2, l'IL-15 et l'IL-21 orientent principalement l'activation des cellules NK vers la cytotoxicité.

Comme discuté précédemment, la capacité de répondre à l'IL-15 est acquise de manière très précoce sur les cellules NK lors de leur différenciation et maintenue sur les cellules NK matures. Le récepteur à l'IL-15 est composé des chaînes **γ** et **IL2R- β (CD122)**, partagées avec le récepteur à l'IL-2 et exprimées de manière constitutive, et de la chaîne **IL-15R α** exprimée par les cellules NK elles-mêmes ou à la surface des cellules productrices d'IL-15 (Carson et al., 1994a; Dubois et al., 2002; Zanoni et al., 2013). Ainsi, l'IL-15 permet l'activation des fonctions effectrices des cellules NK, et plus particulièrement de leur cytotoxicité ; par exemple en augmentant l'expression de la **perforine** via l'activation de **STAT-5a** et **STAT-5b** (Bluman et al., 1996; Carson et al., 1994a; Fehniger et al., 2007; Zhang et al., 1999). De manière intéressante, lorsqu'elle est associée à la sous-unité **IL-15R α** , sous forme membranaire ou soluble, l'IL-15 est plus efficace que sous forme soluble monomérique (Kobayashi et al., 2005; Chertova et al., 2013). Par ailleurs, la surexpression de la protéine anti-apoptotique Bcl2 dans des Souris CD122KO entraîne la restauration du nombre de cellules NK mais pas de leur fonction cytotoxique, suggérant que l'IL-15 participe également à la **maturation fonctionnelle** des cellules NK, par une voie distincte de celle responsable de leur développement (Minagawa et al., 2002; Vosshenrich et al., 2005). Enfin l'IL-15 induit également la **prolifération** des cellules NK, toutefois dans une moindre mesure que l'IL-2 (Carson et al., 1994b).

Contrairement à l'IL-15, l'IL-2 n'intervient pas dans le développement des cellules NK, mais elle augmente leurs fonctions effectrices en favorisant la traduction des ARNm préformés de **perforine** et **granzyme** ; ou l'adhérence avec leur cible (Trinchieri et al., 1984; Kehrl et al., 1988; Wang et al., 2000; Fehniger et al., 2003, 2007; Gasteiger et al., 2013; Boyman and Sprent, 2012). Les cellules NK CD56^{bright} à l'état basal ainsi que les cellules CD56^{dim} activées expriment le récepteur à l'IL-2 de haute affinité (addition de la chaîne IL-2R α ou **CD25**), les rendant ainsi sensibles à de très faibles doses d'IL-2 (Caligiuri et al., 1990; Leong et al., 2014; Nagler et al., 1989). Toutefois, l'effet de l'IL-2 sur les cellules NK peut être limité par la présence de LT régulateurs (**Tregs**), qui expriment également le récepteur à l'IL-2 de haute affinité, et qui peuvent ainsi capter l'IL-2 présente dans le microenvironnement (Gasteiger et al., 2013). Tout comme l'IL-15, l'IL-2 induit l'activation des facteurs de transcription **STAT-5a** et **STAT-5b** dans les cellules NK (Lin et al., 1995). L'IL-2 est également capable de potentialiser les effets de l'IL-12 en augmentant l'expression des sous-unités **IL-12R β 1** et **IL-12R β 2** sur les cellules NK (Wang et al., 2000).

L'IL-21 potentialise la **prolifération**, la **maturation fonctionnelle** et les **fonctions effectrices** et **anti-tumorales** des cellules NK (Wang et al., 2003; Brady et al., 2004; Iannello et al., 2010; McMichael et al., 2017). *In vitro*, elle augmente la **survie** et l'**expansion** des cellules NK (Skak et al., 2008; Parrish-Novak et al., 2000). Par ailleurs, elle serait capable d'induire la différenciation de cellules NK de type **mémoire** (Venkatasubramanian et al., 2017). Toutefois, d'autres études rapportent que l'IL-21 induit l'**apoptose** des cellules NK *in vitro* (Li et al., 2015). D'autre part, elle agit également sur les CD8⁺ en favorisant leur prolifération, leur production d'IFN- γ et leur cytotoxicité, et ce au détriment des cellules NK. Elle jouerait ainsi un rôle important dans la régulation de la transition entre réponse innée et adaptative *in vivo* (Kasaian et al., 2002). Le rôle de l'IL-21 est ainsi controversé, soulignant à nouveau l'importance du microenvironnement dans l'intégration des signaux régulateurs.

Contrairement aux cytokines de la famille γ C, les cytokines de la **famille de l'IL-12** comme l'IL-12, l'IL-23 et l'IL-27, stimulent plutôt les fonctions sécrétrices des cellules NK.

L'**IL-12**, initialement identifiée comme facteur stimulant les cellules NK parmi les cellules mononuclées du sang (Peripheral Blood Mononuclear cells, PBMCs) cultivées *in vitro* (NK cell stimulatory factor, **NKSF**), est également capable d'induire la **prolifération**, la production d'**IFN- γ** et dans une moindre mesure la **cytotoxicité** des cellules NK, via l'activation du facteur de transcription **STAT-4** (Kobayashi et al., 1989; Bacon et al., 1995; Kaplan et al., 1996). Ainsi, la production d'IFN- γ par les cellules NK en réponse à l'IL-12 seule est relativement faible, mais est largement augmentée lorsque les cellules sont pré-activées ou cultivées en présence d'autres cytokines telles que l'IL-18 (Chaix et al., 2008). L'**IL-23** active la production d'IFN- γ par les cellules NK CD56^{bright}, seule ou en synergie avec l'IL-18, soulignant ainsi des similitudes avec l'IL-12 (Ziblat et al., 2018).

L'**IL-27** potentialise la production d'**IFN- γ** et la **cytotoxicité** des cellules NK via l'augmentation de l'expression de **perforine** et de **TRAIL** lorsqu'elle est combinée avec l'IL-15. Ainsi, deux études indépendantes ont démontré un effet anti-tumoral de l'IL-27 chez la souris, médié par une augmentation des fonctions effectrices des cellules NK (Liu et al., 2008b; Chiyo et al., 2005; Matsui et al., 2009). L'IL-27 permet également d'augmenter la réponse des cellules NK à l'IL-18 via l'augmentation de l'expression de T-bet notamment (Ziblat et al., 2015). Cependant, d'autres études ont montré que l'IL-27 inhibe la prolifération induite par l'IL-15 et l'IL-12, et induit la production d'**IL-10** par les cellules NK, leur conférant ainsi des propriétés **régulatrices** en inhibant la réponse T (Laroni et al., 2011). Le rôle de l'IL-27 reste donc controversé et dépend probablement du contexte et de l'environnement cytokinique. Les effets de l'IL-27 sont principalement médiés par l'activation des voies **STAT-1** et **STAT-3** (Hibbert et al., 2003).

Des cytokines de la **famille de l'IL-1** exercent également des effets positifs sur la biologie des cellules NK, et sont essentiellement des amplificateurs de la réponse à l'IL-2, l'IL-15 et l'IL-12.

En effet, de par leur expression constitutive du récepteur à l'**IL-18**, cette dernière peut à elle seule induire la production modérée d'**IFN- γ** par les cellules NK (Okamura et al., 1995). Toutefois, comme décrit précédemment, lorsqu'elle est combinée avec d'autres cytokines telles que l'IL-12 ou encore l'IL-15, l'effet de l'IL-18 est fortement potentialisé pour augmenter la production d'IFN- γ mais également la **cytotoxicité** des cellules NK (Okamura et al., 1998; Lauwerys et al., 1999; Fehniger et al., 1999; Chakir et al., 2001; Strengell et al., 2003; Chaix et al., 2008; Haeberlein et al., 2010; Wang et al., 2009). Par opposition, les autres cytokines appartenant à la famille des IL-1s, telles que l'**IL-1 α** ou l'**IL-1 β** ne sont pas capables d'activer les cellules NK par elles-mêmes, mais uniquement en combinaison avec d'autres cytokines dont l'IL-12 (Hunter et al., 1995, 1997). Ce point sera de nouveau abordé dans la partie des résultats ainsi qu'à travers la discussion.

Par ailleurs, les IFN de type I (**IFN- α** , **IFN- β**) régulent indirectement les fonctions des cellules NK en induisant la production d'**IL-15** ou directement en augmentant l'expression de **perforine** et de **Fas-L** et la sécrétion d'**IFN- γ** via l'activation de **STAT-1** (Nguyen et al., 2002; Liang et al., 2003; Martinez et al., 2008). Toutefois, d'autres études ont mis en évidence que l'activation de STAT-1 par les IFN de type-I induit un switch au détriment de la voie STAT-4, limitant ainsi la production d'IFN- γ dans certains contextes (Nguyen et al., 2000; Miyagi et al., 2007). Plus récemment, il a été suggéré que l'IFN- λ (IFN de type III) participe également au développement et à la fonctionnalité des cellules NK chez la souris, plus particulièrement pour la production d'**IFN- γ** (Souza-Fonseca-Guimaraes et al., 2015; Gimeno Brias et al., 2018). Toutefois, cette notion est aujourd'hui encore controversée chez l'homme (Krämer et al., 2011).

Par opposition, certaines cytokines exercent un effet inhibiteur sur l'activation des cellules NK. Ainsi, le **TGF- β** inhibe la prolifération des cellules NK induites en réponse à l'IL-2, mais également la production d'IFN- γ et la cytotoxicité induites par l'IL12 et l'IL-15 (Bellone et al., 1995; Laouar et al., 2005; Ghiringhelli et al., 2005). Ces effets immuno-régulateurs sont en partie médiés par l'activation des protéines **Smad** qui vont elles-mêmes inhiber l'expression du facteur de transcription **T-bet** nécessaire à la production d'IFN- γ par les cellules NK ; mais également inhiber l'expression de **STAT-4** et d'**IL-12R β 2** (Lin et al., 2005; Yu et al., 2006b).

Enfin, l'**IL-10**, sécrétée majoritairement par certaines populations de LT suppressives, les monocytes et les macrophages ou par les cellules tumorales directement, peut également inhiber les fonctions effectrices et anti-tumorales des cellules NK en diminuant directement la mobilisation des granules cytotoxiques et la production d'IFN- γ (Carson et al., 1995; D'Andrea et al., 1993; Baessler et al., 2010; Stringaris et al., 2014).

De manière intéressante, l'**IL-4**, généralement impliquée dans les réponses immunitaires de type-2, induit la production d'**IL-13** et d'**IL-5** par les cellules NK et diminue leur prolifération et leur cytotoxicité en réponse à l'IL-15 ou l'IL-2 (Warren et al., 1995; Peritt et al., 1998; Brady et al., 2010; Nagler et al., 1988).

Ces cytokines sont essentiellement produites par les cellules immunitaires activées, telles que les **LT** (IL-2, IL-21), les **DCs conventionnelles** (IL-12, IL-27, IL-18, IFN- β , IL-15, IFN β/λ) et **plasmacytoïdes** (IFN- α), les **macrophages** activés (IL-15, IL-12, IL-27, IL-18, IFN β), les **LTh2**, les **mastocytes** ou les **éosinophiles** (IL-4), les **cellules NKT** (IL-4, IL-21) et les **Tregs** (IL-10, TGF- β) et sont responsables d'un dialogue ou « cross-talk » important entre les cellules NK et les autres cellules du système immunitaire (Bihl et al., 2010; Horowitz et al., 2010; Granucci et al., 2004; Zanoni et al., 2013; Carson et al., 1994b; Dubois et al., 2002; Ho and Miaw, 2016; Kasaian et al., 2002; Gasteiger et al., 2013; Ivashkiv and Donlin, 2014). Les cellules NK elles-mêmes sont également sources de cytokines (**IL-15**, **IL-10**) qui vont agir de manière autocrine (Zanoni et al., 2013), de même que les cellules **épithéliales** et les **fibroblastes** de la moelle osseuse (**IL-15**, **IFN- β**) (Ivashkiv and Donlin, 2014; Mrózek et al., 1996). *In vivo*, le microenvironnement cytokinique est complexe et ces médiateurs solubles agissent de concert pour réguler finement le niveau d'activation des cellules NK (Leong et al., 2014; Wang et al., 2000; Nakahira et al., 2002; Haerberlein et al., 2010; Ziblat et al., 2015). A titre d'exemple, l'IL-12 combinée à l'IL-18 joue un rôle crucial dans la réponse à l'infection par *Leishmania infantum* médiée par les cellules NK (Haerberlein et al., 2010). De même, l'IL-4 combinée à l'IL-15 permet d'augmenter légèrement la production d'IFN- γ , de MIP-1 α , de MIP-1 β et de GM-CSF par les cellules NK (Brady et al., 2010). Cette coopération entre cytokines et plus particulièrement la synergie observée entre l'IL-12 et les cytokines de la famille des IL-1s sera plus largement discutée dans les parties de résultats et de discussion de ce manuscrit. Enfin, l'expression des récepteurs respectifs de ces cytokines peut varier entre les sous-types de cellules NK, suggérant ainsi une sensibilité différente selon les sous-populations de cellules considérées. Les différences phénotypiques et fonctionnelles des sous-types de cellules NK seront largement présentées dans la suite de ce manuscrit.

3. Rôle des récepteurs de l'immunité innée

Les cellules NK expriment également des récepteurs activateurs appartenant à la famille des **PRRs** (Pattern Recognition Receptors) tels que les **TLRs** (Toll-Like Receptors) et le récepteur **RIG-I** leur permettant de reconnaître directement des **PAMPs** ou des **DAMPs** (Chalifour et al., 2004; Hornung et al., 2002; Lauzon et al., 2006; Girart et al., 2007; Marcenaro et al., 2008). Par exemple, les cellules NK sont capables de reconnaître directement le pathogène *Mycobacterium bovis* via **TLR2** ou la présence de **poly I:C** mimant un ARN viral double brin par via **RIG-I** (Hart et al., 2005; Marcenaro et al., 2008; Perrot et al., 2010). Plus récemment, il a été observé que l'activation de **TLR3** par les cellules NK joue un rôle essentiel dans la production de cytokines pro-inflammatoires par ces dernières en réponse à une activation par des combinaisons d'IL-12, IL-15 et IL-18 (Guillerey et al., 2015a). Toutefois, contrairement aux cellules phagocytaires, la régulation de l'activité des cellules NK par les récepteurs de l'immunité innée semble dépendante de la présence d'un autre signal d'activation fort, par exemple des cytokines produites par d'autres cellules telles que les cellules myéloïdes (Hart et al., 2005; Perrot et al., 2010) ou supplémentées dans le milieu (Marcenaro et al., 2008).

En conclusion, ces différentes voies d'activation (récepteurs, cytokines, molécules de co-stimulation, adhérence) peuvent agir de concert pour assurer une activation optimale des cellules NK. Par exemple, au cours d'une infection par MCMV, la reconnaissance du peptide viral **m157** par le récepteur **Ly49H** ainsi que la production d'**IFN de type 1** induisent une activation maximale des cellules NK (Pyzik et al., 2011). Ainsi, il a été proposé un parallèle entre l'activation des cellules NK et le modèle des 3 signaux décrit pour les LT : le premier signal serait médié par les récepteurs activateurs et inhibiteurs, le second par les molécules de co-stimulation, et enfin les cytokines pro-inflammatoires assureraient le 3ème signal (Hammer and Romagnani, 2017). Toutefois, bien que ce parallèle soit séduisant, une particularité des cellules NK réside en leur capacité d'activation en réponse à un seul de ces signaux *in vitro* (ligation des récepteurs activateurs ou activation par des cytokines). On peut donc supposer qu'*in vivo*, l'absence d'un de ces trois signaux ne constitue pas un frein à leur activation. Cette hypothèse est en faveur d'une activation plus sensible et rapide des cellules NK, qui va de pair avec leur rôle précoce dans la lutte contre les infections avant la mise en place de la réponse adaptative.

V. Fonctions effectrices et régulatrices des cellules NK

Les cellules NK sont caractérisées par deux grandes fonctions distinctes : la lyse des cellules infectées ou transformées d'une part et la sécrétion de cytokines d'autre part. Les modalités de ces fonctions effectrices sont présentées dans cette partie et dans la **figure 7**.

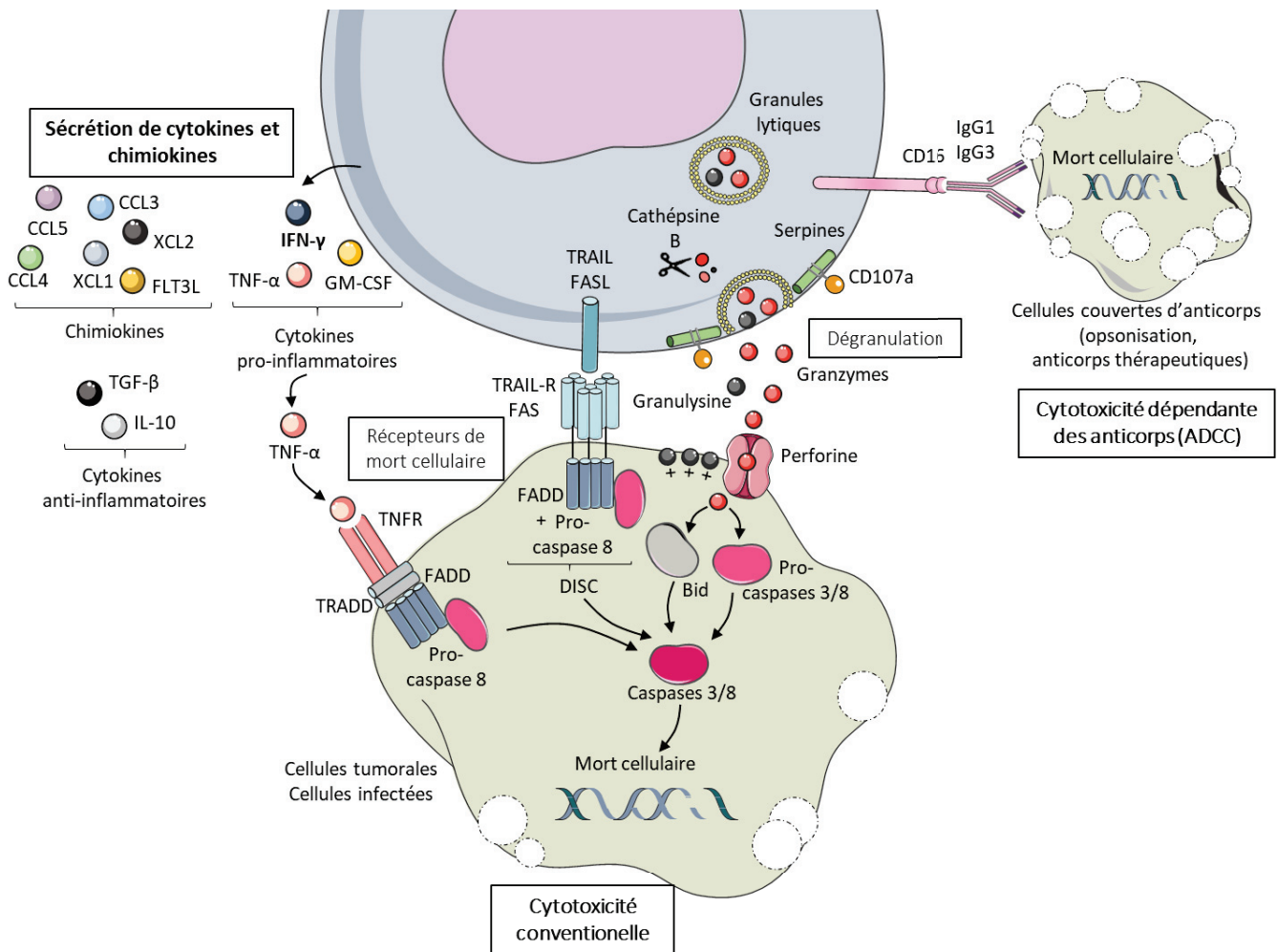


Figure 7. Fonctions effectrices des cellules NK

Les cellules NK participent à la réponse immunitaire innée via deux fonctions effectrices : une fonction sécrétrice et une fonction cytotoxique. En réponse à un signal activateur, les cellules NK sécrètent des cytokines pro-inflammatoires (IFN- γ et TNF- α essentiellement) mais également des chimiokines (CCL2, CCL3, CCL5, XCL1 principalement) qui permettent d'activer et de recruter les autres cellules immunitaires et les cellules NK elles-mêmes. Dans certains cas, les cellules NK peuvent sécréter des cytokines anti-inflammatoires (IL-10, TGF- β) assurant ainsi un rôle de régulateur négatif sur la réponse immunitaire. D'autre part, elles sont capables d'induire la mort des cellules infectées ou tumorales, par trois mécanismes distincts. Tout d'abord, la sécrétion de granules cytotoxiques contenant les protéines perforine, granzymes et granulysine permet de former des pores dans la membrane de la cellule cible (perforine) pour faire rentrer les protéines granzymes qui clivent et activent les pro-caspases 3 et 8 ainsi que la protéine Bid pour activer l'apoptose. Les protéines de granulysine vont quant à elle directement interagir avec les pathogènes ou la membrane de la cellule cible pour permettre leur destruction. Le deuxième mécanisme correspond à l'activation des récepteurs de mort (Fas, TRAIL-R ou TNFR) suite à l'interaction avec leurs ligands respectifs (Fas-L, TRAIL ou TNF- α) exprimés à la surface ou sécrétés par les cellules NK. Ces récepteurs recrutent les complexes DISC (FADD/pro caspase-8) pour TRAIL-R et FAS ou TRADD/FADD/pro-caspase 8 pour TNFR permettant l'activation de la voie extrinsèque de l'apoptose. Enfin, la cytotoxicité dépendante des anticorps ou ADCC (Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity) repose sur l'interaction entre le récepteur CD16 sur les cellules NK et le fragment constant des anticorps fixés à la surface d'une cellule opsonisée ou recouverte d'anticorps thérapeutiques. Cette interaction déclenche la lyse de la cellule cible par les voies décrites précédemment.

1. Fonction cytotoxique des cellules NK

1.1. Cytotoxicité directe

Les cellules NK peuvent tuer leur cible par deux mécanismes principaux, reposant d'une part sur la sécrétion de granules cytotoxiques et d'autre part sur l'expression de récepteurs de mort. Ces deux voies conduisent *in fine* à l'apoptose de la cellule cible.

Contrairement aux lymphocytes T, les cellules NK expriment de manière constitutive la **perforine**, les protéines de la famille des granzymes (**granzyme A, B, H et M**) et la **granulysine**. Ces protéines sont stockées sous forme mature et active dans le cytoplasme, à l'intérieur de lysosomes spécifiques appelés **granules lytiques** (Lettau et al., 2007; Trapani, 2001). Suite à un contact avec une cellule cible, l'activation de voies de signalisation induit un remodelage du cytosquelette permettant l'exocytose de ces granules pour libérer leur contenu cytotoxique au niveau de la synapse immunitaire (van den Broek et al., 1995; Topham and Hewitt, 2009; Mace et al., 2014). La perforine est ensuite capable de se multimériser pour former des pores dans la membrane plasmique et dans la membrane des endosomes, permettant ainsi la libération des granzymes à l'intérieur de la cellule cible (Law et al., 2010; Pipkin and Lieberman, 2007). En tant que sérine-protéases, les **granzymes** sont capables de cliver de nombreuses protéines pro-apoptotiques telles que la **pro-caspase 3** ou **Bid**, conduisant ainsi à la mort cellulaire par apoptose de la cellule cible (Quan et al., 1996; Andrade et al., 1998; Barry et al., 2000). **Granzyme B** est sans doute la protéine ayant le plus grand potentiel pro-apoptotique. Toutefois, les souris déficientes pour l'expression de granzyme B présentent une cytotoxicité réduite mais pas nulle, suggérant une redondance fonctionnelle entre les différents membres de la famille. Par ailleurs, **granzyme A** induit une activation plus faible des caspases mais participe à la cytotoxicité en clivant directement le substrat de ces dernières (Trapani, 2001). En outre, il semblerait que **granzyme H** ne soit pas impliquée dans la mort des cellules cibles mais jouerait un rôle dans le clivage direct de certaines protéines virales, tandis que **granzyme M** semble être capable d'induire à la fois une mort cellulaire dépendante et indépendante des caspases (Andrade et al., 2007; de Poot and Bovenschen, 2014; Kelly et al., 2004). Enfin, la **granulysine** chargée positivement interagit avec les charges négatives présentes à la surface des pathogènes et des cellules tumorales pour induire leur lyse ou leur mort cellulaire par apoptose respectivement (Clayberger and Krensky, 2003; Chen et al., 2016a).

Les cellules NK expriment également à leur surface des ligands des récepteurs dits de « mort » tels que **FasL** et **TRAIL** dont l'expression augmente après activation des cellules par des cytokines (**IL-2, IL-12, IFN- α , IFN- γ**) ou par engagement des molécules de surface **CD16, 2B4** ou encore **LFA-1** (Medvedev et al., 1997; Stegmann et al., 2010; Eischen et al., 1996; Chua et al., 2004). L'interaction de ces ligands avec leurs récepteurs respectifs (**FasR** et **TRAIL-R1/R2**) exprimés à la surface des cellules cibles entraîne, dans la cellule cible, le recrutement de la protéine FADD qui s'associe elle-même à la pro-caspase-8 pour former le complexe protéique **DISC** (Death-Inducing Signaling Complex) permettant l'activation de la voie **d'apoptose dite extrinsèque** par auto-clivage et activation de la **pro-caspase 8** (Medema et al., 1997; Guicciardi and Gores, 2009; LeBlanc and Ashkenazi, 2003; Kischkel et al., 2001).

Par ailleurs, les cellules NK produisent du **TNF- α** , qui interagit directement avec son récepteur, TNFR, pour recruter les protéines TRADD, FADD et la pro-caspase-8 et activer la voie extrinsèque de l'apoptose dans la cellule cible (Ross and Caligiuri, 1997; Micheau and Tschopp, 2003). On parle ainsi de cytotoxicité induite par les cytokines. La fonction sécrétrice des cellules NK sera plus largement abordée dans le paragraphe suivant.

Les cellules NK ont évolué de manière à développer un ensemble de mécanismes régulateurs les protégeant de leur propre cytotoxicité. Par exemple, après dégranulation, l'expression de **CD107a** à leur surface empêche la fixation de la perforine tandis que leur expression de **cathepsine B** permet le clivage et l'inactivation des protéines contenues dans les granules lytiques (Cohnen et al., 2013; Balaji et al., 2002). Par ailleurs, l'expression d'inhibiteurs des sérines protéases telles que les **serpines** dans les cellules NK permet d'inhiber les granzymes présentes dans la synapse immunitaire et qui peuvent être re-dirigées vers la cellule NK (Sun et al., 1996; Hirst et al., 2003). De la même manière, au cours de la réponse immunitaire et de l'activation des cellules NK, le fratricide entre cellules NK effectrices est en partie limité par un maintien d'une forte expression du **CMH-1** (Chua et al., 2004).

Laquelle de ces deux voies de cytotoxicité est préférentiellement utilisée par les cellules NK pour induire la mort de leurs cibles et comment ces deux mécanismes sont régulés sont des questions qui font l'objet de nombreuses études récentes. Ainsi, il a été observé que la lyse médiée par les granules lytiques induit la mort de la cellule cible plus rapidement que la voie des récepteurs de mort (Li et al., 2016; Zhu et al., 2016). Par ailleurs, une partie des cellules NK a la capacité de réaliser du « **serial-killing** », c'est-à-dire de se détacher de leur cible pour aller directement tuer une autre cellule cible avoisinante (Netter et al., 2017; Bhat and Watzl, 2007). Le développement parallèle de systèmes rapporteurs de l'activité des protéases et des techniques d'imagerie a permis de démontrer que le premier évènement cytotoxique est quasiment systématiquement rapide et médié par les granules. Cet évènement s'accompagne d'une diminution du stock de granules dans le cytoplasme et d'une augmentation de l'expression de **FasL** à la surface des cellules. Progressivement, on observe donc un changement vers une cytotoxicité plus lente et dépendante de la voie **Fas/FasL**, probablement lorsque le stock de granules est épuisé. Ainsi, le dernier évènement cytotoxique est quasi systématiquement dépendant de la voie **Fas/FasL** (Beaudouin et al., 2013; Liesche et al., 2018; Prager et al., 2019).

1.2. Cytotoxicité dépendante des anticorps ou ADCC

De par l'expression du récepteur **CD16A (FcγRIIIA)**, les cellules NK sont capables de reconnaître et de lier la partie constante (fragment Fc) des Ig. Cette interaction **FcγR/Fc** permet l'activation de domaines **ITAM** intracytoplasmiques et des kinases **Lck** et **ZAP70**, induisant ainsi l'activation des fonctions **cytotoxiques** des cellules NK (Lanier et al., 1988; Morel et al., 1999; Salcedo et al., 1993; Cone et al., 1993; Smyth et al., 2005). Cette cytotoxicité appelée **ADCC** (Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity) joue un rôle crucial dans l'élimination des cellules recouvertes d'anticorps, suite au phénomène d'**opsonisation** ou suite à un traitement par des **anticorps thérapeutiques** de classe **IgG1** et **IgG3** chez l'homme et **IgG2a/b** chez la souris (Chung et al., 2011; Wang et al., 2015). De manière intéressante, une sous-population de cellules NK exprimerait également le récepteur inhibiteur **FcγRIIB (CD32c)**, dont l'engagement limiterait l'ADCC de ces dernières (Dutertre et al., 2008).

1.3. Rôle régulateur de l'activité cytotoxique des cellules NK

De par leur activité cytotoxique, les cellules NK ont un rôle régulateur central dans de nombreux processus physio-pathologiques.

En induisant la mort cellulaire de leur cible, les cellules NK sont à l'origine d'une source importante d'antigènes qui vont être captés pas les DCs avoisinantes pour permettre la **cross-présentation** antigénique et la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative spécifique et puissante (Vivier et al., 2008).

Au-delà de leur cytotoxicité envers les cellules infectées ou transformées, les cellules NK peuvent également lyser des cellules non infectées et non transformées. Par exemple, elles sont capables de directement lyser les **DCs immatures**, assurant ainsi l'homéostasie du réservoir de DCs mais pouvant également limiter l'efficacité de certains vaccins (Wilson et al., 1999; Piccioli et al., 2002; Hayakawa et al., 2004). De la même manière, la lyse directe des DCs présente dans le greffon par les cellules NK assure la tolérance en cas de greffes allogéniques en limitant l'activation de LT alloréactifs (Yu et al., 2006a). Les cellules NK vont également réguler la réponse immunitaire adaptative, en lysant directement les **LT** ou **LB**. En effet, il a été démontré *in vitro* que l'activation des LT induit une augmentation rapide à leur surface de l'expression du **CMH-1** et de ligands du récepteur activateur **NKG2D**, entraînant la lyse spécifique des LT via un mécanisme dépendant de la **perforine** (Rabinovich et al., 2003). De manière corolaire, la déplétion des cellules NK dans un modèle d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) augmente l'auto-immunité en empêchant l'élimination des LT auto-réactifs (Winkler-Pickett et al., 2008). Dans un contexte d'infection par le Virus de l'Immunodéficience Humaine (**HIV**), les cellules NK seraient également responsables de la lyse directe des **LT CD4⁺** infectés exprimant des ligands activateurs de **NKp44** (Vieillard et al., 2005). Par ailleurs, en contexte d'infection par **HBV**, les cellules NK peuvent directement lyser les LT spécifiquement dirigés contre HBV, via un mécanisme dépendant de la voie TRAIL, limitant ainsi la réponse anti-virale (Peppas et al., 2013). Des observations similaires ont été faites chez la souris en contexte d'infection chronique par le virus **MCMV** où il a été observé une lyse spécifique des **LT CD4⁺** par les cellules NK exprimant TRAIL (Schuster et al., 2014). En se basant sur l'observation que les cellules NK s'accumulent dans le foie à partir de 5 jours après une infection, plusieurs groupes ont proposé qu'elles pourraient être impliquées dans l'**apoptose** des cellules **T CD4⁺** et **T CD8⁺** observée dans le foie lors de la phase de **résolution** (« clearance ») suite à une réponse immunitaire (Crispe et al., 2000; Rabinovich et al., 2003). L'existence d'un tel mécanisme *in vivo* implique une régulation fine pour limiter la lyse non contrôlée des lymphocytes T. Ainsi, la protection des cellules T activées dans les ganglions peut s'expliquer par une localisation spécifique des cellules NK qui sont exclues de la zone T (Dokun et al., 2001). Par ailleurs, chez la souris, le récepteur inhibiteur **NKG2A/CD94** peut interagir avec la molécule du CMH-1 **Qa-1** exprimée à la surface des lymphocytes T CD4 activés, et transmettre ainsi un signal inhibiteur qui protège ces derniers de la lyse par les cellules NK. En accord avec ceci, il a été démontré que l'utilisation d'anticorps bloquants **NKG2A** dans le modèle d'EAE rompt cette tolérance, permettant la lyse des lymphocytes auto-réactifs et diminuant la sévérité de la réponse auto-immune (Vance et al., 1998; Lu et al., 2007). De manière similaire, il a été démontré que les cellules NK sont capables de directement lyser les **LB** producteurs d'auto-anticorps, et que la déplétion des cellules NK augmente la réaction auto-immune (Takeda and Dennert, 1993). Dans un contexte tumoral, on peut imaginer que ce rôle régulateur des cellules NK sur les cellules immunitaires activées pourrait limiter l'efficacité des immunothérapies visant à réactiver ou potentialiser la réponse immunitaire.

Enfin, les cellules NK peuvent également lyser des cellules non-immunitaires telles que les cellules endothéliales en conditions d'infection ou de greffe (Yoneda et al., 2000; Bolovan-Fritts and Spector, 2008), les **hépatocytes** en cas d'infection chronique par **HBV** ou les **cellules β** du pancréas en cas de diabète induit par infection virale (Dunn et al., 2007; Chen et al., 2007; Flodström et al., 2002).

2. Fonction sécrétrice des cellules NK

Les cellules NK sont également capables de produire de grandes quantités de cytokines et de chimiokines qui vont largement réguler les réponses immunitaires et influencer l'activité d'autres cellules immunitaires. D'un point de vue global, ces médiateurs solubles assurent trois grandes fonctions : un contrôle immunitaire précoce en contexte infectieux et tumoral, la maturation des DCs

et la polarisation des cellules T effectrices. De par leur capacité à répondre rapidement à des signaux qui ne dépendent pas de la présentation antigénique par les CPAg, les cellules NK sont la source principale de cytokines dans les phases précoces des réponses immunitaires (Beznan et al., 2012).

L'**IFN- γ** permet de soutenir les réponses immunitaires anti-bactériennes ou anti-tumorales en agissant directement sur les cellules immunitaires ou sur les cellules tumorales elles-mêmes. En effet, l'**IFN- γ** permet la sur-activation des macrophages afin d'amplifier leurs fonctions bactéricides. Il permet également d'augmenter l'expression des molécules de co-stimulation sur les CPAg et du **CMH-1 sur les cellules tumorales ou infectées** permettant ainsi leur élimination par les LT CD8+ activés (Ikeda et al., 2002). En retour, ces cellules sécrètent de l'**IL-12** qui agit sur l'activation des cellules NK (Bancroft et al., 1991; Newport et al., 1996; Jouanguy et al., 1999; Kaplan et al., 1998; Mocikat et al., 2003). Des travaux récents ont montré lors d'infections bactériennes et virales que l'**IFN- γ** dérivé des cellules NK soutient la production d'**IL-12** par les cDC1 (Alexandre et al., 2016). En accord avec cette observation, l'**IFN- γ** favorise la différenciation des LT naïfs en **LTh1**, eux même producteurs d'**IFN- γ** et nécessaire à l'activation des **LT CD8⁺ cytotoxiques** (Dalton et al., 1993; Huang et al., 1993; Mocikat et al., 2003; Murphy et al., 2000; Martín-Fontecha et al., 2004; Morandi et al., 2006). En outre, l'**IFN- γ** joue un rôle clé dans le recrutement des cellules NK au sein des tumeurs (Wendel et al., 2008). Enfin, l'**IFN- γ** exerce directement des effets anti-prolifératifs et anti-métaboliques sur les cellules tumorales ainsi que anti-angiogéniques sur les cellules endothéliales (Ikeda et al., 2002). La transcription d'ARN messagers codant l'**IFN- γ** est observée dès les stades précoces de différenciation des cellules NK et de manière constitutive, et augmente au cours de leur maturation ou de l'activation pour permettre la traduction et la sécrétion de grandes quantités d'**IFN- γ** en quelques minutes seulement (Stetson et al., 2003).

Par ailleurs, en plus de son rôle direct dans la réponse cytotoxique, le **TNF- α** sécrété par les cellules NK exerce un rôle régulateur sur la réponse immunitaire. Par exemple, il agit en synergie avec l'**IFN- γ** pour induire la maturation des DCs (Vitale et al., 2005; Degli-Esposti and Smyth, 2005; Moretta et al., 2006) et augmenter leur capacité à effectuer la présentation croisée des antigènes tumoraux aux LT CD8+ (Deauvieu et al., 2015). Le **TNF- α** agit également de manière autocrine sur le recrutement, la production d'**IFN- γ** et la cytotoxicité des cellules NK en contexte viral et tumoral. Toutefois, contrairement à l'**IFN- γ** , d'autres cellules innées sont également capables de produire cette cytokine a des temps précoces (Almishri et al., 2016; Orange and Biron, 1996; Kashii et al., 1999; Baxevanis et al., 2000; Wang et al., 2012; Orange et al., 1995).

En outre, la production de **GM-CSF** et de **M-CSF** par les cellules NK régule le recrutement, la différenciation et la survie des monocytes et des cellules myéloïdes (Cuturi et al., 1989; Ushach and Zlotnik, 2016).

Les cellules NK produisent également un grand nombre de chimiokines telles que **CCL3**, **CCL4**, **CCL5**, **XCL1 (ATAC/lymphotactin)** et **XCL2**, majoritairement en réponse aux cytokines (IL-15 seule ou combinée avec l'**IL-12** ou l'**IL-2**) et agissent de manière paracrine sur le recrutement et l'activation des macrophages, des DCs et des LT mais également autocrine sur les cellules NK en augmentant leur recrutement et leur cytotoxicité (Bluman et al., 1996; Fahey et al., 1992; Dorner et al., 2002; Crozat et al., 2010; Loetscher et al., 1996; Maghazachi and Al-aoukaty, 1998; Oliva et al., 1998; Castellino et al., 2006). Il a été récemment démontré que la production de **XCL1** et **CCL5** par les cellules NK intratumorales est impliquée dans le recrutement des cDC1 dans les tumeurs (Böttcher et al., 2018). Enfin, les cellules NK sont capables de produire la cytokine **Fit3L** qui joue un rôle essentiel dans la différenciation des cellules dendritiques, favorisant par exemple l'accumulation de ces dernières au sein des tumeurs (Barry et al., 2018).

A l'inverse, dans certains contextes précis, les cytokines sécrétées par les cellules NK peuvent exercer un rôle anti-inflammatoire. Par exemple, les cellules NK peuvent sécréter de l'**IL-10** (Mehrotra et al., 1998; Perona-Wright et al., 2009; Jiang et al., 2018; Deniz et al., 2008) et du **TGF- β** (Horwitz et

al., 1997; Gray et al., 1998; Esplugues et al., 2003; Jiang et al., 2018), en réponse à une activation avec de fortes concentrations d'IL-2, en contextes d'infections systémiques aiguës ou d'infections virales. Ces cytokines immunomodulatrices agissent de manière autocrine en inhibant l'activation des cellules NK ou paracrine en inhibant la prolifération des LT activés. Il a ainsi été proposé que ces cellules NK productrices de cytokines immunosuppressives et dites **régulatrices** par homologie avec les Tregs, joueraient un rôle dans la tolérance, le contrôle de l'inflammation systémique ou au cours de la phase de résolution après une infection (Horwitz et al., 1999; Perona-Wright et al., 2009; Deniz et al., 2008; Maroof et al., 2008).

En outre, les caractéristiques et le rôle unique des cellules **NK utérines** ne seront que très peu discutés dans ce manuscrit car hors du champ de mon travail de thèse. Toutefois, la capacité des cellules NK utérines à sécréter des facteurs pro-angiogéniques, tels que le **VEGF**, ou des protéines immuno-modulatrices telles que la **galectine-1**, soulève la question d'un potentiel rôle de ces cellules dans la néo-angiogenèse et la croissance tumorale (Koopman et al., 2003; Hanna et al., 2006; Chou et al., 2018).

En conclusion, les cellules NK sont capables de produire une grande diversité de cytokines dont la nature semble dépendante du signal activateur. Ainsi, la combinaison d'**IL-12** et **IL-18** semble être optimale pour la sécrétion d'**IFN- γ** ; tandis que l'**IL-15** et l'**IL-18** induisent des quantités supérieures de **GM-CSF** que les autres combinaisons de cytokines. De manière corolaire, une cytokine donnée n'est généralement pas produite en réponse à tous les signaux activateurs (Brady et al., 2004; Cooper et al., 2001; Moretta et al., 2002). Ces résultats suggèrent que le contexte cytokinique conditionne fortement la fonction sécrétrice des cellules NK.

VI. Diversité phénotypique et fonctionnelle des cellules NK

Les cellules NK matures subissent une différenciation dite tardive, donnant ainsi naissance à un ensemble de sous-types de cellules NK effectrices. Ces différentes sous-populations et leurs caractéristiques fonctionnelles et phénotypiques sont présentées dans cette partie et dans les figures **8**, **9** et **10**.

1. La dichotomie CD56^{bright} et CD56^{dim} chez l'homme

Historiquement, on distingue deux grands sous-types de cellules NK chez l'homme, *i. e.* **CD56^{bright}** et **CD56^{dim}**, sur la base du niveau d'expression de CD56 à leur surface. Cette distinction **phénotypique** traduit plus largement des différences **transcriptionnelles**, **fonctionnelles** et **physiopathologiques** fondamentales (**Figure 8**). Comme discuté précédemment, les cellules NK **CD56^{bright}** expriment à leur surface un ensemble de récepteurs aux chimiokines et de molécules d'adhésion (**CCR7**, **CD62L**, **CXCR3**, **CCR5**) permettant leur localisation préférentielle au niveau des **OLS**, en proximité directe avec les DCs et les LT naïfs avec lesquels elles entretiennent une interaction dynamique (Fehniger et al., 2003; Ferlazzo et al., 2004; Bajénoff et al., 2006). Elles assurent essentiellement une fonction immuno-régulatrice en produisant de grandes quantités de cytokines (**IFN- γ** , **TNF- α** , **GM-CSF**) (Campbell et al., 2001; Cooper et al., 2001). Elles présentent toutefois une faible activité cytotoxique en réponse à une activation par des cytokines. Elles sont enfin caractérisées par une expression forte des récepteurs aux cytokines (**IL-2R**, **IL-12R**, **IL-18R**, **IL-21R**) et d'un niveau plus important d'activation de STAT-4 en réponse à une activation par l'IL-12 (Juelke et al., 2010; Yu et al., 2010; Björkström et al., 2010; Cooper et al., 2001; Wendt et al., 2007). Ainsi, elles répondent donc

essentiellement à un signal cytokinique mais que très peu à l'engagement de leurs récepteurs activateurs (Hanna et al., 2004; Fauriat et al., 2010; Schlums et al., 2015). Enfin, elles expriment le récepteur de haute affinité pour l'IL-2 de manière constitutive et présentent une **prolifération** plus importante (Caligiuri et al., 1990; Vitale et al., 2004)

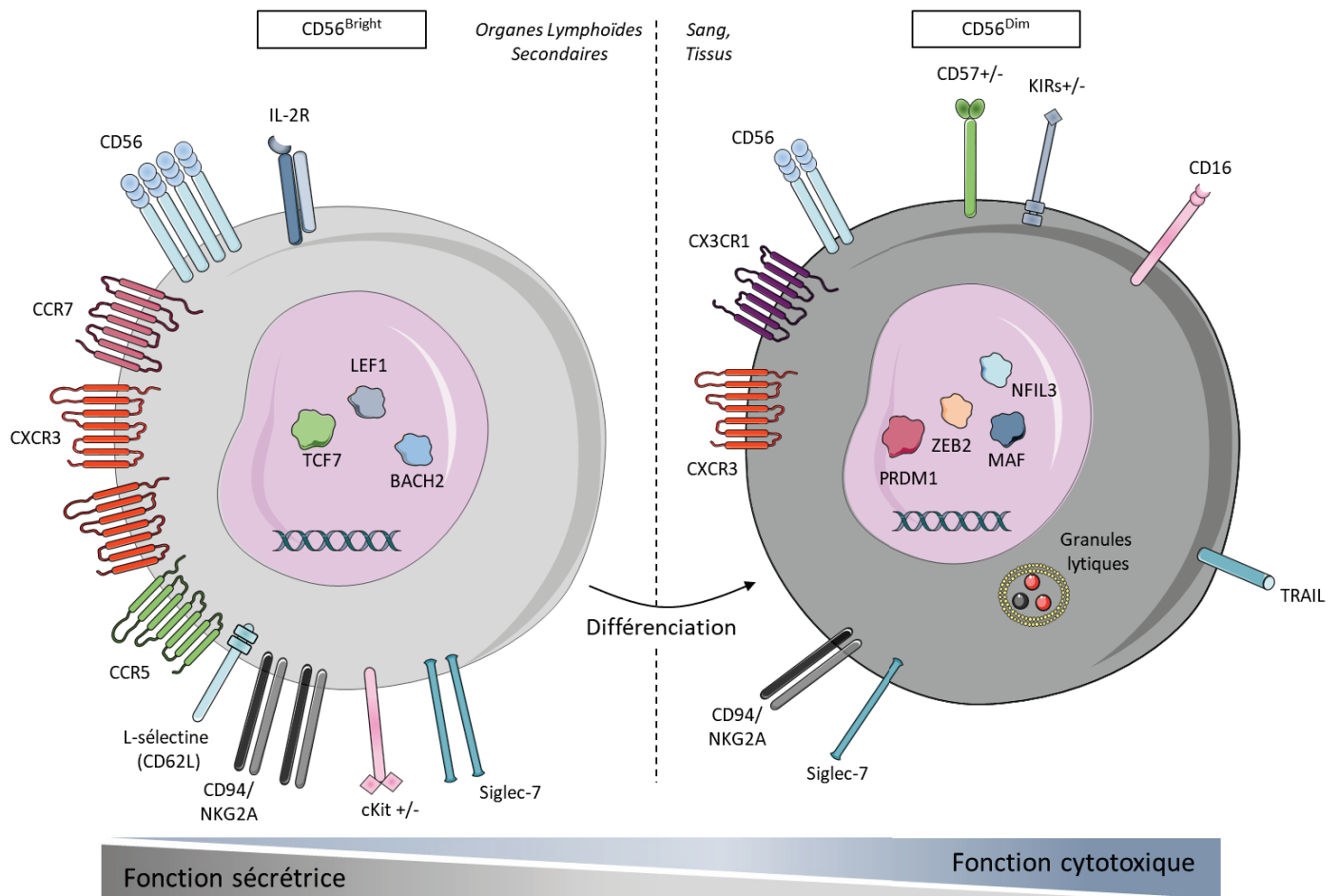


Figure 8. Caractéristiques phénotypiques, transcriptionnelles et fonctionnelles des cellules NK CD56^{bright} et CD56^{dim} chez l'homme

Chez l'homme, les cellules NK matures sont divisées en deux sous-populations selon le niveau d'expression de CD56 à leur surface : les cellules NK CD56^{bright} et les cellules NK CD56^{dim}. Les cellules NK CD56^{bright} expriment les récepteurs CCR7 et CD62L permettant leur migration dans les OLS. Elles répondent fortement à une activation par les cytokines et produisent des taux élevés de cytokines et chimiokines. Elles ont une activité cytotoxique non négligeable bien qu'inférieure à celle des cellules NK CD56^{dim}. En effet, ces dernières sont plus sensibles à la reconnaissance d'une cellule cible et possèdent des capacités cytotoxiques accrues. Leur activité sécrétrice est réduite par rapport aux cellules NK CD56^{bright}. Elles perdent l'expression des récepteurs CCR7 et CD62L; permettant ainsi leur sortie des OLS vers le sang. Elles expriment CX3CR1 permettant ainsi leur recrutement dans les tissus périphériques en cas d'inflammation. CXCR3 est exprimé sur les cellules NK résidentes des tissus, qu'elles soient CD56^{dim} ou CD56^{bright}.

Par opposition, les cellules NK **CD56^{dim}** représentent 90% des cellules NK **circulantes** et sont caractérisées par une forte activité **cytotoxique** suite à l'engagement de leurs récepteurs activateurs par une cellule cible. Elles expriment également le récepteur **FcγRIII** (ou **CD16**), leur donnant ainsi la capacité **d'ADCC** (Nagler et al., 1989). Les cellules NK **CD56^{dim}** présentent des capacités prolifératives très réduites, en réponse à l'IL-2 notamment (Baume et al., 1992; Lutz et al., 2011). A l'inverse, elles expriment une plus grande diversité de récepteurs activateurs et inhibiteurs, ce qui les rend plus prônes à répondre à des variations d'expression de ligands de ces récepteurs en présence d'un pathogène intracellulaire ou suite à un stress oncogénique. Il semble désormais largement accepté que les cellules NK **CD56^{dim}** sont issues de la **différenciation** des cellules NK **CD56^{bright}**. En effet, ces dernières sont enrichies dans les tissus néonataux et dans le sang prélevé du cordon ombilical, et correspondent aux premières cellules NK observées dans le sang après une greffe de cellules souches hématopoïétiques. Par ailleurs, elles sont capables de donner naissance à des cellules NK **CD56^{dim}** en réponse à l'**IL-15** ou en réponse au facteur de croissance **FGF1** *in vitro* (Huntington et al., 2009; Chan et al., 2007). En accord avec ce modèle de différenciation linéaire, la fréquence des cellules NK **CD56^{dim}** augmente au cours de la vie et ces dernières présentent des télomères plus courts (Borrego et al., 1999; Chan et al., 2007; Romagnani et al., 2007).

Enfin, des programmes transcriptomiques et épigénétiques les différencient, et ce point sera abordé à la fin de ce paragraphe.

2. Différenciation et maturation tardive des cellules NK **CD56^{dim}**

Plus récemment, un certain degré d'hétérogénéité phénotypique et fonctionnelle a été décrit au sein de la population NK **CD56^{dim}**, suggérant que ces cellules continuent à se différencier établissant ainsi un paysage plus complexe que la dichotomie historiquement établie. Ainsi, des sous-types intermédiaires ont pu être isolés et caractérisés par l'expression de **CD62L** ou **CD94/NKG2A** ; et l'absence d'expression de **CD57** et des **KIRs** (Björkström et al., 2010; Yu et al., 2010). De manière intéressante, les cellules NK **CD56^{dim} CD94^{bright}** sont caractérisées par une **polyfonctionnalité** qui s'illustre par leur capacité à produire d'importantes quantités d'IFN-γ en réponse à une activation par les cytokines mais également par une activité cytotoxique forte en réponse à l'engagement de leurs récepteurs activateurs, bien qu'à des niveaux intermédiaires entre les sous-types **CD56^{bright}** et **CD56^{dim} CD94^{low}** respectivement (Yu et al., 2010). Dans ces cellules, le niveau de pSTAT-4 en réponse à l'IL-12 est supérieur par rapport aux cellules NK **CD56^{dim} CD94^{low}**, expliquant ainsi leur capacité élevée à produire de l'IFN-γ. Ainsi, les cellules NK **CD56^{dim}** peuvent continuer à se différencier et acquérir un phénotype de cellules terminalement différenciées. Par exemple, l'expression des **KIRs** est acquise de manière séquentielle avec dans un premier temps l'expression de **KIR2DL2/3**, puis **KIR3DL1** et enfin **KIR2DL1** (Miller and McCullar, 2001; Fischer et al., 2007; Schönberg et al., 2011). Elles acquièrent également l'expression de **CD57** ou de **CX3CR1** (Lopez-Vergès et al., 2010; Hamann et al., 2011; Sciumè et al., 2011). La fonctionnalité de ces cellules terminalement différenciées reste aujourd'hui vivement débattue. En effet, certaines études les identifient comme hautement fonctionnelles et cytotoxiques par rapport aux autres cellules NK **CD56^{dim}** chez l'homme (Collins et al., 2019). De même, leur capacité d'ADCC croît au cours de leur différenciation avec l'augmentation progressive de l'expression de **CD16** (Björkström et al., 2010; Juelke et al., 2010; Lopez-Vergès et al., 2010; Yu et al., 2010). Ces données sont en accord avec d'autres études identifiant l'expression de **CD57** comme un marqueur de différenciation terminale des **LT CD8⁺**, voire de sénescence (Brenchley et al., 2003). Toutefois, leur forte activité cytotoxique chez l'homme est en opposition avec l'hypothèse que **CD57** serait un marqueur d'exhaustion ou de sénescence pour les cellules NK (Lopez-Vergès et al., 2010). La notion

émergente d'exhaustion des cellules NK sera discutée dans le paragraphe traitant des cellules NK en contexte tumoral. Enfin, l'origine développementale de ces cellules est également discutée. Toutefois, l'expression de **CD57** et des **KIRs** semble irréversible, ce qui est en faveur d'un modèle de différenciation linéaire des cellules NK **CD56^{bright} CD94⁺** en cellules NK **CD56^{dim} CD16⁺ CD94^{+/-} CD57⁻ KIR^{+/-} intermédiaires** puis **CD56^{dim} CD16⁺⁺ CD94⁻ CD57⁺ KIR⁺ terminalement différenciées**. Par ailleurs, l'analyse transcriptomique sur cellule unique (**single-cell RNA-seq, sc-RNA-seq**) de ces différents sous-types identifie les cellules NK **CD56^{dim} CD57⁺** comme directement descendantes des cellules NK **CD56^{dim} intermédiaires** (Collins et al., 2019).

Les signaux responsables de la différenciation des cellules NK **CD56^{dim}** en cellules terminalement différenciées restent à identifier. La différenciation des cellules NK étant largement contrôlée par les cytokines, ces dernières pourraient être impliquées dans l'établissement des cellules NK **CD56^{dim}** mais cette hypothèse reste à évaluer.

Ainsi, l'identification et la caractérisation de nouvelles sous-populations de cellules NK ne cesse de croître. Le développement récent des techniques de profilage de « *haute dimension* » transcriptomique à l'échelle de populations cellulaires globales (micro-bulk **RNAseq**) ou de la cellule unique (single-cell **RNAseq, sc-RNAseq**) mais également phénotypique (cytométrie de flux multiparamétrique ou cytométrie de masse, **CyToF**) a permis l'identification d'un ensemble de molécules spécifiquement exprimés par les cellules NK par rapport aux autres cellules immunitaires mais également par certaines sous-populations de cellules NK (Hanna et al., 2004; Björklund et al., 2016; Crinier et al., 2018; Collins et al., 2019; Dogra et al., 2020). Ces différentes études ont permis de définir des « signatures » transcriptomiques propres aux cellules NK par rapport aux autres cellules immunitaires et des signatures propres aux cellules NK **CD56^{bright}** ou **CD56^{dim}**. Ces signatures sont présentées dans la **figure 9** et ont été utilisées pour nos analyses transcriptomiques et épigénétiques qui seront présentées dans les parties résultats et discussion.

3. Sous-types de cellules NK chez la souris

L'absence d'expression du **CD56** par les cellules NK murines rend difficile le parallèle avec les cellules NK humaines. Toutefois, différents stades de maturation ont également été identifiés chez la souris, sur la base de l'expression de **CD11b** et de **CD27**. Brièvement, les cellules **NK CD11b⁻ CD27⁺** sont majoritairement retrouvées dans la **moelle** et les **ganglions** et sont considérées **immatures**. Leur différenciation donnerait successivement naissance à deux sous-populations de NK **matures**, i. e. **CD11b⁺ CD27⁺** puis **CD11b⁺ CD27⁻**, retrouvées dans la **rate** et le **sang** essentiellement. Les cellules NK **CD11b⁺ CD27⁺** seraient à l'origine des cellules NK **CD11b⁺ CD27⁻** et ont une capacité de prolifération, sécrétoire et cytotoxique plus élevée que ces dernières. Ainsi, par opposition avec les observations faites chez l'homme, ces résultats identifient les cellules NK murines les plus terminalement différenciées comme moins fonctionnelles (Chiossone et al., 2009; Hayakawa et al., 2006). En accord, il a été observé que l'expression de **CX3CR1**, marqueur de cellules NK terminalement différenciées, est associée à une expression accrue du récepteur inhibiteur **KLRG1** et ces cellules présentent une activité réduite (Sciumè et al., 2011). Ainsi, ces résultats soulignent des différences entre les modèles murins et les études faites chez l'homme. Les analyses transcriptomiques par **sc-RNAseq** sur les différents sous-types de cellules NK murines et humaines ont permis de définir les différences mais également les similitudes existant entre les deux espèces, facilitant ainsi le transfert des connaissances obtenues dans des modèles murins chez l'homme (Marquardt et al., 2010; Crinier et al., 2018).

Cellules NK (20 gènes)	Cellules NK CD56 ^{bright} (22 gènes)	Cellules NK CD56 ^{dim} (32 gènes)
<i>CD160</i>	<i>CD44</i>	<i>CD164</i> <i>LCP1</i>
<i>CD244</i>	<i>CD82</i>	<i>CD274</i> <i>LGALS1</i>
<i>CTSW</i>	<i>CD83</i>	<i>CD99</i> <i>PTGDS</i>
<i>FASLG</i>	<i>CMC1</i>	<i>FCGR3A</i> <i>RBM38</i>
<i>GZMA</i>	<i>CNN2</i>	<i>CFL1</i> <i>S100A4</i>
<i>GZMB</i>	<i>COTL1</i>	<i>CST7</i> <i>SAR1A</i>
<i>GZMH</i>	<i>CXCR3</i>	<i>CTSD</i> <i>SPON2</i>
<i>IL18RAP</i>	<i>GZMK</i>	<i>CYBA</i> <i>TLE1</i>
<i>IL2RB</i>	<i>HLA-DRB1</i>	<i>DSTN</i> <i>TPM3</i>
<i>KIR2DL4</i>	<i>IFRD1</i>	<i>EIF3B</i> <i>ZEB2</i>
<i>KLRB1</i>	<i>LTB</i>	<i>EMP3</i>
<i>KLRC2</i>	<i>NCF1</i>	<i>ENC1</i>
<i>KLRD1</i>	<i>OCIAD2</i>	<i>FGFBP2</i>
<i>KLRF1</i>	<i>PDE4B</i>	<i>GTF3C1</i>
<i>KLRK1</i>	<i>PPP1R14B</i>	<i>GZMA</i>
<i>NCR1</i>	<i>RGCC</i>	<i>GZMB</i>
<i>NKG7</i>	<i>RPL36A</i>	<i>GZMH</i>
<i>PRF1</i>	<i>SCML1</i>	<i>IGFBP7</i>
<i>XCL1</i>	<i>SPOCK2</i>	<i>ITGB2</i>
<i>XCL2</i>	<i>VIM</i>	<i>KIR2DL3</i>
	<i>XCL1</i>	<i>KLRD1</i>
	<i>ZFP36L2</i>	<i>LAIR2</i>

Figure 9. Signatures transcriptionnelles des cellules NK totales, CD56^{bright} et CD56^{dim} chez l'homme

Les techniques d'analyse de l'expression génique à large échelle ou transcriptomique par séquençage à ARN (RNAseq, sc-RNAseq) ont permis d'identifier des listes de gènes associés aux cellules NK par rapport aux autres cellules mais également associés aux différentes sous-populations. Ces gènes définissent des marqueurs d'identité ou de fonctionnalité. Certains de ces gènes ne sont pas spécifiques des cellules NK, mais c'est leur combinaison qui permet d'associer un profil transcriptomique à ces dernières : on parle de « signature ». Ces signatures sont extraites de Cursons et al., 2019 pour la signature des cellules NK dans leur ensemble et de Crinier et al., 2018 pour les signatures des cellules NK CD56^{bright} et CD56^{dim}. Les gènes sont classés par ordre alphabétique.

VII. Cellules NK et mémoire immunitaire

Bien que n'exprimant pas de récepteurs spécifiques aux antigènes *per se*, de nombreux résultats récents convergent vers l'hypothèse que les cellules NK sont également dotées d'une capacité de mémoire immunitaire. Ils seront présentés et discutés dans cette partie.

1. Preuve de concept : expansion, contraction, maintenance

Suite à une infection par le virus **MCMV** chez la souris, les cellules NK suivent les quatre phases typiques d'une réponse immunitaire adaptative mémoire : la phase d'**expansion**, de **contraction**, suivie de la **maintenance** sélective d'une sous-population spécifique, et enfin la phase de **ré-activation** préférentielle et de manière accrue de ces cellules en cas de second challenge immunitaire. En effet, en réalisant une greffe de moelle chez des souris déficientes pour l'expression du récepteur **Ly49H**, il a été observé que suite à une infection par **MCMV**, des cellules nouvellement greffées **Ly49H⁺** spécifiques de l'antigène **m157** de MCMV sont capables de proliférer, rétablissant ainsi une fréquence de cellules Ly49H⁺ identique à celle observée chez des souris sauvages infectées (de 25% à presque

90%). Cette prolifération exponentielle et spécifique est suivie d'un déclin des cellules Ly49H⁺ pour progressivement revenir à une fréquence identique à celle avant infection. En réalisant des transferts adoptifs de cellules NK CD45.1⁺ dans des souris exprimant CD45.2 et déficientes pour la voie de signalisation induite par Ly49H (*Dap12*-KO), des cellules NK CD45.1⁺ sont retrouvées dans la rate et dans le foie 70 jours après infection. Ces cellules NK persistantes sont capables de répondre à une seconde stimulation par le même antigène (*i. e.* m157) en produisant de l'IFN- γ ; avec une fréquence et une quantité d'IFN- γ plus importantes que les cellules NK CD45.1⁺ naïves (Sun et al., 2009). Ces résultats mettent en évidence pour la première fois la capacité des cellules NK à développer une réponse mémoire amplifiée et protectrice face à un second challenge par le même antigène.

2. Phénotype et différenciation des cellules NK mémoires

Chez la souris, ces cellules **NK** dites « **mémoires** » sont caractérisées par une augmentation de l'expression du récepteurs **Ly49H** impliqué dans la reconnaissance directe de la protéine virale m157 et des récepteurs **CD43** et **Ly6C** impliqués dans l'activation et l'adhérence des cellules NK respectivement. Elles expriment fortement le marqueur **KLRG1** qui témoigne de leur prolifération intense au cours de la phase d'expansion. Elles sont CD11b⁺ et n'expriment pas ou peu le **CD27** ; elles sont donc considérées comme **matures** (Figure 10). Enfin, elles présentent un nombre absolu de transcrits codant l'IFN- γ plus élevé que les cellules NK naïves (Bezman et al., 2012; Sun et al., 2009). Cette notion de cellules NK mémoires a également été observée en réponse à une infection par l'*Herpes Simplex Virus-2* chez la souris (Abdul-Careem et al., 2012).

Chez l'Homme, des cellules similaires ont été observées et définies comme cellules NK **adaptatives**. En effet, une fréquence plus importante de cellules **NK CD56^{dim}** exprimant fortement **NKG2C** et **CD57** mais caractérisées par une forte diminution de **NKG2A** a été rapportée chez les individus **HCMV**-séropositifs, chroniquement infectés par **HBV** et **HCV**, par l'**hantavirus Pumalaa** ou par le **virus du Chikungunya**. Ces cellules **NKG2C⁺** sont capables de proliférer de manière spécifique en réponse à une primo-infection ou une ré-activation du virus, subissent une phase de contraction et persistent longtemps après l'élimination du pathogène, caractéristiques normalement restreintes aux cellules immunitaires mémoires (Lopez-Vergès et al., 2010, 2011; Foley et al., 2012; Béziat et al., 2012; Björkström et al., 2011; Petitdemange et al., 2011). Mécanistiquement, il a été démontré en contexte d'infection par le virus **HCMV** que la fixation de peptides issus de la protéine virale **UL40** sur les molécules HLA-E est reconnue par le récepteur activateur **NKG2C** induisant ainsi l'activation et l'expansion clonale des cellules NK **NKG2C⁺** (Hammer et al., 2018). Par ailleurs, un enrichissement en cellules NK **CD57^{bright}** et **CD45RO⁺** a été observé chez les patients infectés par **HIV-1** ou par *Mycobacterium tuberculosis*, suggérant que ces marqueurs pourraient également être utilisés pour définir une signature des cellules NK adaptatives chez l'Homme (Hong et al., 2010; Fu et al., 2011) (Figure 10). Dans certaines de ces études et contrairement à ce qui a été observé chez la souris, les cellules NK adaptatives chez l'homme ont parfois été associées à une **déficiences** pour la production d'IFN- γ au profit d'une **cytotoxicité élevée**, en accord avec leur profil de cellules NK **CD56^{dim}** terminalement différenciées (Petitdemange et al., 2011).

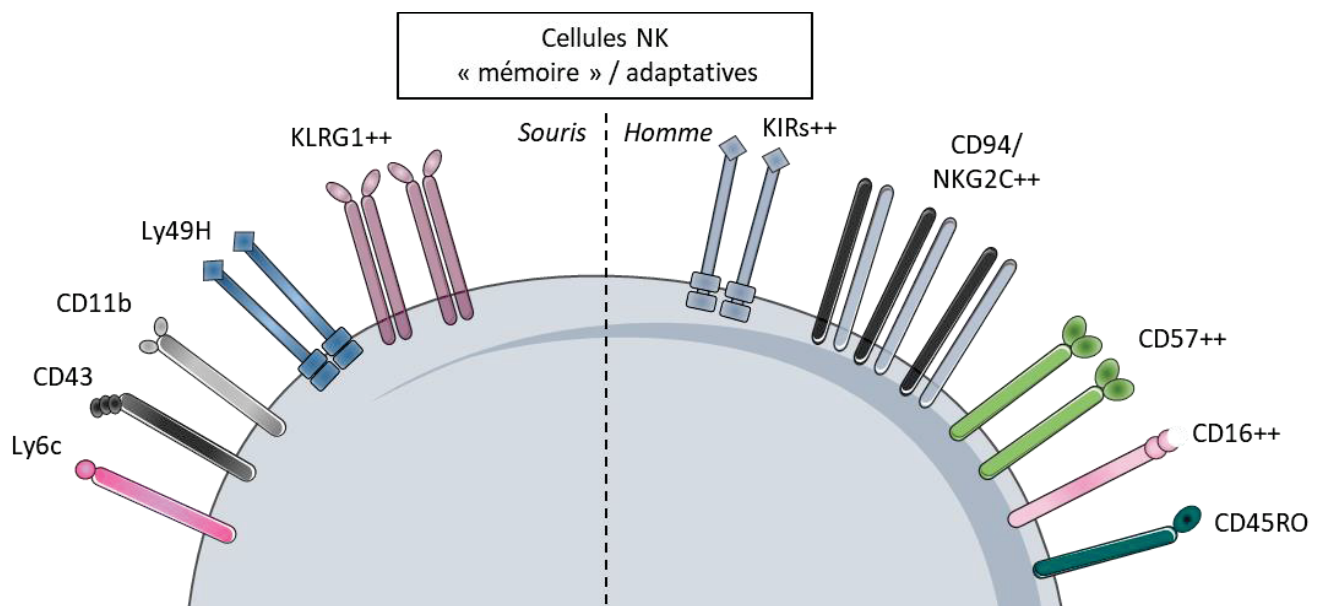


Figure 10. Caractéristiques phénotypiques des cellules NK « mémoires » ou adaptatives chez la souris et chez l'homme

Comme pour les cellules de l'immunité adaptative, des caractéristiques de cellules mémoires ont été mises en évidence chez les cellules NK. En effet, suite à une infection virale, les cellules NK subissent les 4 phases caractéristiques de la mémoire immunitaire : expansion, contraction, persistance et réactivation. Ces cellules NK de type « mémoire » chez la souris ou adaptatives chez l'homme peuvent être identifiées par la co-expression d'un ensemble de marqueurs de surface présentés ci-dessus. Chez la souris, on observe une augmentation du récepteur activateur Ly49H directement impliqué dans la reconnaissance du pathogène et des molécules CD43 et Ly6C respectivement impliquées dans l'activation et l'adhérence de ces cellules NK. L'expression forte de KLRG1 témoigne de la prolifération intense de ces cellules. Chez l'homme, les cellules NK adaptatives sont caractérisées par une diminution de l'expression du récepteur inhibiteur NKG2A au profit d'une augmentation de l'expression du récepteur activateur NKG2C, d'un ensemble de KIRs, du récepteur CD16 et du marqueur CD57. Certaines études rapportent également l'expression de CD45RO à la surface des cellules NK adaptatives observées en contexte d'infection chronique.

Les voies de différenciation de ces cellules mémoires ou adaptatives n'est pas encore clairement établi, et leur différenciation pourrait se faire de manière linéaire ou pourrait intervenir à différents stades de maturation. En faveur de l'hypothèse d'une voie de maturation non linéaire, la génération de cellules mémoires à partir de cellules NK CD56^{bright} a pu être observée chez l'Homme (Romee et al., 2012). Toutefois, des études transcriptomiques dans le modèle MCMV indiquent que les cellules NK mémoires et les cellules NK effectrices tardives isolées 7 jours après infection (non mémoires) partagent le plus fort degré d'homologie par rapport aux cellules naïves ou effectrices précoces (Beznan et al., 2012).

De par leur phénotype mais également par leur capacité à assurer une protection immunitaire, ces cellules NK mémoires partagent de nombreuses similitudes avec les LT mémoires. D'un point de vue évolutif, deux modèles peuvent aboutir à ces similitudes entre cellules NK et LT : un modèle où les cellules adaptatives sont issues de l'évolution des cellules innées ou un modèle selon lequel les deux systèmes se sont développés en parallèle au cours de l'évolution. Cette question demeure largement non résolue. Toutefois, par contraste avec la mémoire décrite pour les LT et LB, il a été suggéré que les

cellules NK peuvent acquérir les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles « mémoires » en réponse à une stimulation *in vitro*. En effet, alors qu'une exposition continue à l'IL-15 induirait un état d'épuisement des cellules NK, la combinaison d'IL-15, IL-12 et IL-18 génère des cellules NK « **cytokine-induced memory-like** » ou **CIML** (Berrien-Elliott et al., 2015; Felices et al., 2018) selon des mécanismes non identifiés. De manière intéressante, ces cellules présentent une capacité accrue de lyse des cellules cibles par rapport aux cellules naïves (Romee et al., 2012). Cette capacité de réponse accrue des cellules NK « mémoires » induites *in vitro* est conservée sur une longue période et observée tant dans les cellules qui ont directement été en contact avec les cytokines *in vitro* que dans les cellules issues de la division de ces dernières après une ré-injection *in vivo* (Cooper et al., 2009). Cette observation ainsi que d'autres études faisant l'état d'importants remodelages de la chromatine en réponse aux cytokines sont en faveur d'un contrôle **épigénétique** du programme « mémoire ».

En conclusion, la capacité des cellules NK à déployer des caractéristiques mémoires *in vitro* (**CIML**) est d'un grand intérêt pour les thérapies anti-tumorales basées sur le transfert adoptif de cellules NK qui seront présentées à la fin de ce premier chapitre. Toutefois, l'existence de cellules NK mémoires ou adaptatives en présence d'une tumeur et la relevance de cette population dans la réponse anti-tumorale restent encore à démontrer.

VIII. Régulation transcriptionnelle et épigénétique de la différenciation des cellules NK

Le profil transcriptionnel des cellules NK varie selon leur niveau d'activation ainsi que leur état de différenciation (*i.e.* immatures ou matures), naïves, effectrices ou « mémoires »/adaptatives (Obata-Onai et al., 2002; Hanna et al., 2004; Dybkaer et al., 2007; Bezman et al., 2012). De manière intéressante, ces analyses du transcriptome par **RNA-seq** ont permis de montrer un parallèle entre les cellules NK et les LT pour les compartiments effecteurs et mémoires. En revanche, pour le compartiment naïf les cellules NK se distinguent par un état de pré-activation en accord avec leur rôle précoce (Bezman et al., 2012). D'un point de vue transcriptionnel, les cellules NK naïves sont caractérisées par l'expression des facteurs de transcription **T-bet**, **Eomes**, **Id2**, **Runx3** et **Tox**. Elles acquièrent par ailleurs l'expression de **Foxm1** conjointement avec l'acquisition des fonctions effectrices ; puis l'expression de **Hopx** et **Themis2** au cours de la phase mémoire (Bezman et al., 2012; Lau et al., 2018; Collins et al., 2019). De la même manière, il a été identifié que les cellules NK **CD56^{bright}** enrichies dans les OLS et **CD56^{dim}** circulantes et périphériques ont des profils transcriptionnels et épigénétiques différents dépendants des facteurs de transcription **TCF1 (TCF7)**, **LEF1** et **BACH2** d'une part ou **Blimp1 (PRDM1)**, **ZEB2**, **MAF** et **NFIL3** respectivement (Collins et al., 2019) (**Figure 8**).

Les régulateurs de ces différents programmes transcriptionnels sont restés longtemps non caractérisés. Toutefois, l'analyse couplée du paysage épigénétique et transcriptionnel (Assay for Transposase-Accessible Chromatin, **ATAC-seq** et **RNA-seq** respectivement) a permis l'identification de mécanismes régulant la différenciation du lignage NK. Ainsi, des remaniements profonds et parfois durables (30% des remaniements observés persistent à long terme) de l'accessibilité de la chromatine ont été observés dans les cellules NK au cours de leur activation et différenciation de l'état naïf à effecteur puis mémoire. La majorité de ces modifications épigénétiques correspondent à des ouvertures de la chromatine au niveau des régions régulatrices dites « enhancers », et ont lieu avant la formation des cellules NK mémoires, suggérant un engagement précoce vers cet état de différenciation. Ces modifications sont induites directement en réponse à l'activation de facteurs de transcription par les cytokines. Ainsi, l'activation de la voie **STAT-4** par l'IL-12 induit une forte augmentation de l'accessibilité de la chromatine tandis que l'activation de **STAT-1** par les **IFN de type 1** induit plutôt une diminution de l'ouverture de la chromatine. Ces régions différenciellement

accessibles corrént généralement avec les changements observés dans l'expression de gènes cibles régulant les fonctions effectrices (**Prf1**, **GrzB**) mais également la transcription (**Tcf7**, **Zeb2**, **Tox**, **Nf- κ b1**, **Themis2**) (Lau et al., 2018; Collins et al., 2019). Les mécanismes impliqués dans ce remodelage de la chromatine demeurent largement non identifiés. Toutefois, il a été observé que l'histone méthyl-transférase **Ezh2** modifie les marques épigénétiques de la chromatine dans les cellules NK, inhibant ainsi leur différenciation en cellules NK matures (Yin et al., 2015). De manière intéressante, le blocage de **Ezh2** dans les cellules NK induit une augmentation de l'expression de **IL2R- β** (**CD122**) et de **NKG2D**, respectivement associées à une augmentation de leur prolifération et de leur cytotoxicité envers les cellules tumorales (Yin et al., 2015).

Ces résultats identifient pour la première fois une relation de cause à effet entre l'activation de facteurs de transcription spécifiques en réponse à des cytokines et des modifications épigénétiques et transcriptionnelles régulant la différenciation des cellules NK. De manière intéressante, un grand nombre de ces facteurs de transcription (**Tcf1**, **Zeb2**, **Bach2**) sont également connus pour réguler la différenciation des LT CD8⁺ naïfs en effecteurs puis mémoires, soulignant à nouveau l'existence de programmes de différenciation communs entre cellules cytotoxiques innées et adaptatives (Zhou et al., 2010; Weber et al., 2011; Johnson et al., 2018; Omilusik et al., 2015; Roychoudhuri et al., 2016). Ces études ont ouvert la voie à un nouveau champ d'investigation du paysage épigénétique des cellules NK, en réponse à différents stimuli (cytokines, engagement des récepteurs activateurs par une cible) ou différents contextes environnementaux tels que la présence d'une tumeur ou d'une infection chronique.

En conclusion, l'immuno-phénotypage des cellules NK chez l'Homme mais également chez la souris permet d'identifier, de suivre et de mieux caractériser différents sous-types de cellules NK ainsi que leurs fonctions. La combinaison de marqueurs de surface (récepteurs activateurs, inhibiteurs ou récepteurs aux cytokines et chimiokines) définit ce que l'on appelle le répertoire NK et, bien que moins vaste que le répertoire des lymphocytes adaptatifs, des études de spectrométrie de masse ont pu estimer qu'il n'existe pas moins de 30 000 sous-types de cellules NK distincts chez un individu unique (Horowitz et al., 2013). Mieux caractériser les différentes sous-populations de cellules NK et déchiffrer les mécanismes qui régulent leur différenciation et diversification est crucial afin de pouvoir ensuite exploiter les caractéristiques propres à chacun de ces sous-types au profit de différents contextes cliniques (tumeur, infections virales, placentation...).

IX. Cellules NK et cancer

Dénotées Natural Killer d'après leur capacité à naturellement tuer les cellules tumorales *in vitro* en l'absence d'autres signaux activateurs, les cellules NK jouent un rôle central en contexte tumoral. L'étude des cellules NK infiltrant les tissus et les tumeurs a longtemps été limitée par l'absence de marqueur unique et spécifique des cellules NK chez l'Homme. Toutefois, il a été observé que les cellules NK infiltrent les tumeurs solides du poumon (Carrega et al., 2008), du rein (Schleypen et al., 2003, 2006), du sein (Mamessier et al., 2011), gastro-intestinales (Rusakiewicz et al., 2013) et du côlon (Halama et al., 2011). La fréquence des cellules NK intratumorales varie fortement selon la localisation des tumeurs. En effet, les cellules NK peuvent représenter jusqu'à 40% des lymphocytes (Schleypen et al., 2003) et entre 5% à 20% des cellules immunitaires infiltrants la tumeur (Carrega et al., 2008;

Rusakiewicz et al., 2013) alors qu'elles peuvent être peu représentées dans les tumeurs colorectales (Halama et al., 2011). On retrouve également des cellules NK dans les effusions pleurales de patientes atteintes de cancer de l'ovaire (Carlsten et al., 2009). Elles peuvent infiltrer la tumeur de manière homogène ou être localisées à la marge de la tumeur voire exclusivement dans le stroma adjacent (Carrega et al., 2008). Les cellules NK sont également retrouvées dans les sites métastatiques. Par exemple, en contexte de mélanome métastatique chez l'homme, il a été observé un enrichissement en cellules NK **CD56^{dim} CD57⁺ KIR⁺ CD69⁺ CCR7⁺** dans les ganglions lymphatiques envahis par rapport aux ganglions non envahis. Ces cellules NK sont activées et particulièrement cytotoxiques envers les cellules tumorales autologues (Ali et al., 2014). Mécanistiquement, l'expression de récepteurs et molécules favorise l'infiltration des cellules NK dans les tissus et leur interaction avec la matrice extracellulaire afin d'infiltrer tant la tumeur primaire que les métastases distantes (Putz et al., 2017).

1. Phénotypage des cellules NK dans les tumeurs humaines

Le phénotypage des cellules NK infiltrant les tumeurs demeure incomplet à ce jour. En effet, il a été rapporté que les cellules NK infiltrant les tumeurs du poumon ou du sein sont majoritairement **CD56^{bright} CD16⁻** (Carrega et al., 2008; Mamessier et al., 2011). En revanche, dans une autre étude dans le cancer du poumon, les cellules NK intra-tumorales sont **CD56^{dim}** chez une majorité de patients (26/30) et **CD56^{bright}** chez une minorité de patients (4/30), avec une présence généralement exclusive des deux sous-types (Platonova et al., 2011). Chez des patients atteints de syndrome myélodysplasique, un phénotype mixte a été observé avec la présence de cellules NK **CD56^{bright}** et **CD56^{dim} immatures** (KIR3DL1⁻, KIR2DL1⁻), associées à une altération de la cytotoxicité et une plus grande fréquence de développement de leucémies. Dans le cancer de l'ovaire, les cellules NK sont **CD56^{dim} CD57⁺ KIR⁺** (Pesce et al., 2017). Ainsi, ces observations sont en faveur d'un rôle prépondérant des cellules NK **CD56^{dim}** cytotoxiques dans l'élimination des cellules tumorales bien que ce lien n'ait pas été clairement établi. Toutefois, les deux sous-populations expriment des récepteurs aux chimiokines facilitant leur recrutement dans les tumeurs enrichies en ligands respectifs. Par exemple, CCR5 est exprimé spécifiquement par les cellules NK **CD56^{bright}**, **CXCR3** est enrichi sur les cellules NK **CD56^{bright}** et **CX3CR1** est exprimé spécifiquement par les cellules NK **CD56^{dim}**. Ainsi, ces récepteurs jouent un rôle crucial dans le recrutement de ces dernières dans les tumeurs enrichies en ligands tels que **CCL3**, **CCL4** et **CCL5** (pour **CCR5**) ; **MIG**, **ITAC** et **IP-10** (pour **CXCR3**) ou **CX3CL1** (pour **CX3CR1**) (Liu et al., 2008a; Wendel et al., 2008; Park et al., 2019a; Lavergne et al., 2003; Xin et al., 2005; Yu et al., 2007b). La caractérisation phénotypique des cellules NK infiltrant les tumeurs reste donc un enjeu majeur pour mieux comprendre et manipuler leurs fonctions anti-tumorales. Malgré la rareté des cellules NK dans les tissus et les tumeurs, cette caractérisation est rendue possible aujourd'hui grâce au développement des techniques d'analyses protéomiques, transcriptomiques et épigénétiques sur faible nombre de cellules ou sur cellule unique (**CyToF**, **sc-RNA-seq**, **sc-ATAC-seq**). De nombreuses études ont ainsi pu identifier et caractériser les cellules NK dans le cancer du poumon (Zilionis et al., 2019), du sein (Azizi et al., 2018) ou dans des lésions primaires (Li et al., 2019b; Yost et al., 2019) ou métastatiques de mélanome (Andrade et al., 2019). Ces études ont permis de souligner la diversité des cellules NK intra-tumorales, avec l'identification de plusieurs sous-populations ou « clusters » caractérisés par des différences phénotypiques et fonctionnelles. Toutefois, malgré leur présence dans virtuellement toutes les études s'intéressant à l'infiltrat immunitaire dans son ensemble, les cellules NK restent faiblement représentées par rapport aux autres populations immunitaires limitant ainsi leur caractérisation approfondie.

Ainsi, les cellules NK participent largement à la régulation de la croissance tumorale primaire *in situ* et au contrôle des métastases à travers de multiples mécanismes, directs ou résultant du dialogue ou « **cross-talk** » entre plusieurs populations cellulaires, qui sont exposés dans le paragraphe suivant.

2. Surveillance anti-tumorale médiée par les cellules NK

Les mécanismes d'immunosurveillance médiée par les cellules NK sont présentés dans la **figure 11**.

2.1. Preuves de concept chez la souris

Les cellules NK jouent un rôle essentiel dans la régulation de l'établissement des tumeurs de par leur capacité à détecter les cellules tumorales dès les premiers stades de la transformation. Ainsi, dans différents modèles de tumeurs spontanées, transplantées ou induites par un carcinogène chez la souris, la déplétion spécifique des cellules NK ou de protéines importantes pour leur fonction (i. e. **perforine**, **IFN- γ** , **NKG2D**, **DNAM-1**, **NKp46**) par manipulation génétique ou par le biais d'anticorps déplétants, a permis de démontrer l'existence d'une immunosurveillance naturelle en partie médiée par les cellules NK *in vivo* dans des modèles de lymphome, de mélanome, de fibrosarcome, de cancer du poumon, de la prostate et du sein (Riccardi et al., 1980; van den Broek et al., 1995; Street et al., 2001; Smyth et al., 2001; Halftack et al., 2009; Iguchi-Manaka et al., 2008; Guerra et al., 2008; Delconte et al., 2016; Tu et al., 2017; Gao et al., 2017).

Ainsi, pour échapper à la réponse immunitaire adaptative, les cellules en cours de transformation perdent progressivement l'expression du **CMH-1**, devenant ainsi sensibles à la reconnaissance par les cellules NK selon la théorie du « missing-self » précédemment présentée (Kärre et al., 1986; Liao et al., 1991; Oberg et al., 2004). Parallèlement, en réponse à divers stress cellulaires induits par la tumorigénèse, elles acquièrent l'expression d'un ensemble de ligands des récepteurs activateurs tels que **MICA**, **MICB** et les protéines **ULBPs** pour **NKG2D** (Gasser et al., 2005; Lakshmikanth et al., 2009); **PVR** et **nectine-2** pour **DNAM-1** (Lakshmikanth et al., 2009) ou **B7H6** pour **NKp30** (Brandt et al., 2009). Par ailleurs, l'expression accrue, ectopique ou de variants de certaines protéines cellulaires (les protéines cytoplasmique MLL5 et PCNA ou les protéoglycannes de type héparane sulfate par exemple) est détectée par NKp44 permettant ainsi la lyse des cellules tumorales (Vitale et al., 1998; Parodi et al., 2019). L'expression de récepteurs de mort tels que **Fas** ou **TRAIL-R** est également augmentée à la surface des cellules tumorales.

Tous ces changements sont détectés par les cellules NK, assurant ainsi leur rôle d'immunosurveillance (Bradley et al., 1998; Bauer et al., 1999; Hashimoto et al., 1999; Diefenbach et al., 2000; Cerwenka et al., 2000; Cosman et al., 2001; Screpanti et al., 2001). Une fois activées, les cellules NK favorisent l'élimination des tumeurs et induisent directement la lyse des cellules tumorales via leur activité cytotoxique. De manière intéressante, il a été décrit que la voie de mort dépendante de **TRAIL** induit la mort des cellules tumorales *in vivo* et ce de manière spécifique sans effet délétère sur les cellules normales avoisinantes, constituant ainsi une cible prometteuse pour le développement de thérapies (Walczak et al., 1999; Ashkenazi et al., 1999; Oikonomou et al., 2007; Castro Alves et al., 2012). Par ailleurs, les cellules NK jouent un rôle dans le **contrôle des cellules métastatiques** (Glasner et al., 2012; Sathe et al., 2014; Krasnova et al., 2017; Gao et al., 2017; Van Der Weyden et al., 2018). Ainsi, la transition épithélio-mésenchymateuse (**EMT**), étape nécessaire à la dissémination tumorale, induit l'augmentation de l'expression de certains ligands activateurs de NKG2D (**MICA/B**, **ULBP1-3**) (López-Soto et al., 2013). L'**EMT** induit également la perte d'expression de la cadhérine-E, ligand inhibiteur du récepteur inhibiteur **KLRG1**, en faveur de l'expression de la **cadhérine-N**, ligand activateur de KLRG1 (Chockley et al., 2018). Coinjointement, ces mécanismes participent à la détection

des cellules tumorales par les cellules NK. En effet, elles sont capables de lyser directement les cellules tumorales circulantes, soit suite à l'injection de cellules tumorales dans la circulation, quelques heures seulement après leur injection (Riccardi et al., 1980; Gorelik et al., 1982; Takeda et al., 2001; Halftack et al., 2009; Sathe et al., 2014), ou en contexte plus physiologique dans des modèles de métastases spontanées (Smyth et al., 1999; Glasner et al., 2012; Delconte et al., 2016; Glasner et al., 2018). Un travail récent montre que la déplétion de cellules NK entraîne le développement de métastases spontanées sans influencer la croissance de la tumeur primaire dans le cancer du poumon, suggérant que des mécanismes différents sont impliqués dans le contrôle de la croissance tumorale primaire et métastatique par les cellules NK (Chockley et al., 2018).

Enfin, le dialogue entre les cellules NK et les autres cellules immunitaires régule également indirectement la réponse immunitaire anti-tumorale. Par exemple, le « cross-talk » **NK-DCs** dans les ganglions active les cellules NK qui produisent alors de l'**IFN-γ** mais également induisent la lyse spécifique des DCs immatures (« **DCs licensing** »), afin d'assurer une présentation antigénique efficace aux LT (Morandi et al., 2012; Ferlazzo and Moretta, 2014). Dans la tumeur, la sécrétion des chimiokines **CCL5**, **XCL1** et **XCL2** par les cellules NK infiltrantes engendre le recrutement des DCs conventionnelles de type 1 (**cDC1**), capables d'assurer la présentation croisée des antigènes tumoraux aux LT avoisinants et induit une réponse T spécifique de la tumeur (Böttcher et al., 2018). De la même manière, l'interaction entre cellules NK et LT naïfs favorise la différenciation de ces derniers en **LTh1** pour activer la réponse T CD8⁺ cytotoxique anti-tumorale (Kelly et al., 2002).

2.2. Mise en évidence chez l'homme

La diminution d'expression du **CMH-1** à la surface des cellules tumorales a également été observée à partir de tumeurs extraites de patients atteints de cancer du poumon (Passlick et al., 1996; McGranahan et al., 2017), du sein (Cabrera et al., 1996; Park et al., 2019b), du col de l'utérus (Koopman et al., 2000), du côlon (Cabrera et al., 1998; Sandel et al., 2005) ou encore de l'ovaire (Norell et al., 2006) ; ainsi dans virtuellement tous les types de cancers. Chez l'homme, il est plus difficile de démontrer le rôle des cellules NK dans l'immunosurveillance anti-tumorale. En effet, l'absence d'immunodéficiences restreintes aux cellules NK limite l'établissement de lien causal direct avec l'apparition de cancers chez l'homme (Orange, 2013). La plupart de ces études cliniques sont de ce fait uniquement corrélatives mais permettent de consolider l'idée d'une immunosurveillance naturelle médiée par les cellules NK chez l'Homme (Roder et al., 1980; Ziegler et al., 1981; Hejazi et al., 2015). Ainsi, une étude prospective réalisée sur 11 ans et incluant 3625 individus a mis en évidence une corrélation entre une activité cytotoxique des cellules NK élevée et une plus faible incidence de cancers (Imai et al., 2000). En accord, la cytotoxicité naturelle des cellules NK *in vitro* est plus faible chez les patients atteints de mélanomes, ainsi que chez les individus présentant un risque familial de développement de cancers. Dans ce cas, l'activité des cellules NK est inversement corrélée au nombre d'individus qui ont développé un cancer (Hersey et al., 1979; Strayer et al., 1984; Hejazi et al., 2015). Comme dans les modèles murins, l'activité des cellules NK est également inversement corrélée au développement de métastases chez les patients atteints de cancers de la tête et du cou (Head and Neck, H&N) (Schantz and Ordonez, 1991) ou de mélanome (Messaudene et al., 2014; Cursons et al., 2019).

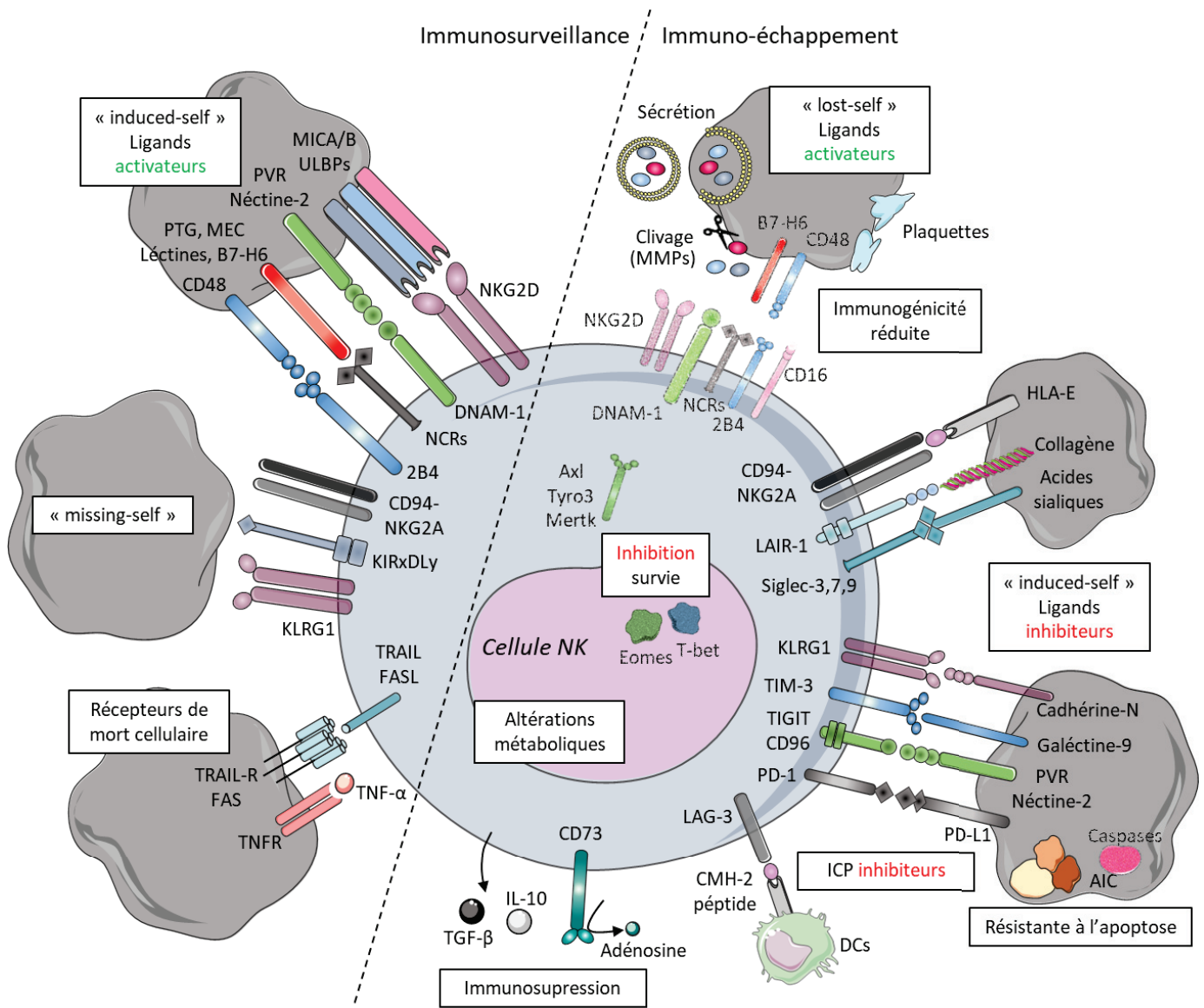


Figure 11. Mécanismes d'immunosurveillance et d'immuno-échappement entre les cellules tumorales et les cellules NK

Les interactions entre les cellules tumorales et les cellules NK sont complexes et évoluent au cours de la tumorigenèse. Ainsi, dans un premier temps, les cellules NK sont capables de reconnaître et d'éliminer les cellules tumorales : on parle d'immunosurveillance. Cette phase permet de limiter de manière efficace la croissance tumorale. Elle repose essentiellement sur la perte d'expression du CMH-1 à la surface des cellules infectées ou tumorales et l'acquisition de l'expression de molécules de stress et ligands (MICA/B, ULBPs, PVR/néctine 2, protéoglycannes) des récepteurs activateurs (NKG2D, DNAM1, NCRs) ou des récepteurs de mort (TRAIL-R, FAS, TNFR) exprimés sur les cellules NK. Toutefois, ces mécanismes vont à terme sélectionner les cellules tumorales capables d'échapper aux cellules NK mais également altérer les capacités d'activation et les fonctions effectrices de ces dernières : on parle d'immuno-échappement. En effet, les cellules cibles peuvent augmenter l'expression de ligands des récepteurs inhibiteurs (HLA-E, collagènes, acides sialiques) ou au contraire diminuer l'expression de ligands activateurs (clivage ou sécrétion des molécules MICA/B, ULBPs, diminution d'expression de B7-H6 ou CD48) pour échapper à la reconnaissance des cellules NK. D'autre part, des modifications des cellules NK elles-mêmes (expression d'ICP, altérations métaboliques, diminution d'expression des récepteurs activateurs) vont limiter l'efficacité des cellules NK. Ainsi, au cours de cette phase, les cellules NK ne contrôlent plus la tumeur de manière efficace et celle-ci va rapidement croître. ICP : Immune CheckPoints, PTG : Protéoglycannes.

Par ailleurs, la présence de cellules NK intra-tumorales corrèle avec un **bon pronostic** dans de nombreux cancers, tels que les cancers gastro-intestinaux (Ishigami et al., 2000; Ménard et al., 2009; Delahaye et al., 2011; Peng et al., 2017; Rusakiewicz et al., 2013), du poumon (Takanami et al., 2001; Villegas et al., 2002; Jin et al., 2014), de l'œsophage (Hsia et al., 2005), du sein (Denkert et al., 2018), dans le mélanome (Barry et al., 2018; Cursons et al., 2019), le carcinome rénal (Eckl et al., 2012), le neuroblastome (Semeraro et al., 2015) et le cancer colorectal pour les patients de haut grade plus particulièrement (Coca et al., 1997). Elle est également inversement corrélée avec le développement de métastases et le grade clinique dans les cancers gastriques et le mélanome (Ishigami et al., 2000; Peng et al., 2017; Cursons et al., 2019). Toutefois, des précautions sont à prendre quant à l'analyse de certaines de ces études. En effet, pour identifier les cellules NK, elles utilisent des marqueurs phénotypiques uniques tels que CD56 et CD57 ou des gènes associés aux fonctions des cellules NK qui ne sont pas exprimés de manière exclusive ni systématique par ces dernières (Coca et al., 1997; Ishigami et al., 2000; Eckl et al., 2012). Dans les tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST), la production d'**IFN- γ** par les cellules NK corrèle avec la survie à long terme (Ménard et al., 2009). Par ailleurs, dans une étude rétrospective sur plus de 20 patients atteints de leucémie ayant reçu une greffe de HSCs, une plus faible incidence de rechute est observée lorsque les complexes HLA du donneur et du receveur présentent un degré de disparité plus élevé (Ruggeri et al., 1999, 2002). En effet, dans ce cas l'absence d'expression des ligands inhibiteurs des **KIRs** du donneur chez le receveur favorise l'élimination des cellules tumorales via l'activation des cellules NK du donneur : on parle ainsi d'effet de la greffe contre la leucémie ou **GvL** (Graft *versus* Leukemia). Ce critère d'incompatibilité entre HLA du donneur et du receveur est désormais quasi systématiquement déterminé, pour identifier les donneurs capables d'induire l'effet GvL le plus important possible et donc le meilleur pronostic pour les patients greffés. Des études plus récentes permettent d'analyser à la fois la présence, la fonctionnalité et les caractéristiques phénotypiques des cellules NK dans les tumeurs grâce à l'utilisation de **signatures moléculaires** comprenant plusieurs gènes (Barry et al., 2018; Cursons et al., 2019).

Enfin, une étude rapporte une absence de corrélation entre les cellules NK et la survie des patients dans le cancer du poumon de type Non Small Cell Lung Cancer (NSCLC) (Platonova et al., 2011). Cette différence peut être due à l'utilisation de marqueurs différents pour identifier les cellules NK, mais peut également refléter une perte de l'activité anti-tumorale des cellules NK au cours de la tumorigénèse et par des mécanismes d'échappement de la tumeur à l'immunosurveillance.

3. Echappement à l'immunosurveillance médiée par les cellules NK

L'ensemble de ces interactions entre les cellules tumorales et les cellules NK et de manière générale avec les cellules immunitaires permet dans un premier temps d'éliminer de manière efficace les cellules transformées. Toutefois, à terme, ce processus va sélectionner des cellules tumorales capables d'échapper à la surveillance immunitaire et des cellules NK moins performantes pour leur fonction anti-tumorale. Par ailleurs, la stimulation chronique des cellules NK par la tumeur induit également une perte progressive de leur capacité d'activation et de réponse. Ces mécanismes responsables d'une perte d'efficacité des cellules NK sont présentés dans ce paragraphe.

3.1. Résistance des cellules tumorales à l'activité des cellules NK

Des modifications des cellules tumorales elles-mêmes favorisent leur échappement à la reconnaissance et à la lyse par les cellules NK. L'ensemble de ces altérations sont présentées dans la **figure 11**.

En effet, les cellules tumorales sont capables d'une part de maintenir ou restaurer l'expression de ligands des récepteurs inhibiteurs et d'autre part de diminuer l'expression de ligands des récepteurs activateurs. Par exemple, l'augmentation de l'expression de **HLA-E**, ligand de **NKG2A**, sur les cellules primaires de myélome est associée à une diminution de la dégranulation et de la cytotoxicité Fas-dépendante des cellules NK (Sarkar et al., 2015; Chua et al., 2004). De la même manière, l'expression à la surface des cellules tumorales primaires ou métastatiques des **acides sialiques** et des **collagènes**, ligands des récepteurs inhibiteurs **LAIR-1** et **Siglec-3/7/9** respectivement, réduit leur immunogénicité envers les cellules NK et corrèle avec la progression tumorale et un mauvais pronostic dans plusieurs types de cancers (Parikka et al., 2003; Iizasa et al., 2004; Banyard et al., 2007; Roepman et al., 2005; Väisänen et al., 2005; Leivonen et al., 2001; Hudak et al., 2014). Il est également commun d'observer une perte progressive de l'expression des récepteurs activateurs ainsi que de leurs ligands sur les cellules tumorales (Chansac et al., 2005). Par exemple, l'expression de **CD48**, ligand du récepteur activateur **2B4**, est directement inhibée par l'expression de protéines oncogéniques (Elias et al., 2014). La perte d'expression des ligands activateurs tels que **MICA**, **MICB**, les protéines **ULBPs** (ligands de **NKG2D**) ou encore de la protéine **B7-H6** (ligand de **NKp30**) sur les cellules tumorales est également fréquemment observée, suite à leur sécrétion via des micro-vésicules ou à leur clivage en facteurs solubles par des métalloprotéinases enrichies dans le microenvironnement tumoral ou libérées dans le sang par les plaquettes recouvrant les cellules tumorales circulantes (Groh et al., 2001; Salih et al., 2002; Chansac et al., 2005; Szczepanski et al., 2011; Zocchi et al., 2012; Reiners et al., 2013; Schlecker et al., 2014; Maurer et al., 2018). L'activation de récepteurs inhibiteurs (CD200, TIM-3) par leurs ligands respectifs exprimés à la surface des cellules tumorales a également été associée à la perte d'expression des récepteurs activateurs (NKp44, NKp46, NKG2D, DNAM1), bloquant ainsi les fonctions anti-tumorales des cellules NK (Coles et al., 2011; da Silva et al., 2014; Gallois et al., 2014; Seo et al., 2017).

Enfin, les cellules tumorales peuvent évoluer pour développer des mécanismes de résistance à l'apoptose induite par les cellules NK. Ainsi, les cellules isolées de cancers agressifs, tels que les cancers du pancréas, du sein, les neuroblastomes ou les mélanomes, montrent une résistance accrue à la cytotoxicité **TRAIL**-dépendante (Hinz et al., 2000; Eggert et al., 2001; Fulda et al., 2001). A titre d'exemple, l'étude d'un grand nombre de lignées tumorales de cancer du sein et du poumon a permis de mettre en évidence une perte d'expression de la **pro-caspase 10**, et moins fréquemment de la **pro-caspase 8** (Kischkel et al., 2001). Les cellules tumorales peuvent également sur-exprimer la protéine **c-FLIP** capable d'interagir avec les **caspases-8** et **10** pour former le complexe anti-apoptotique **AIC** (Apoptotic Inhibitory Complex) au détriment de la formation du complexe pro-apoptotique **DISC** (Safa, 2012). De nombreux autres mécanismes d'échappement de la cellule tumorale à l'apoptose induite par les récepteurs de mort impactant l'efficacité des cellules NK ont été décrits et font l'objet de revues de la littérature (Crowder and El-Deiry, 2012; Dimberg et al., 2013). En outre, il a été décrit que les cellules tumorales circulantes peuvent interagir avec les plaquettes qui vont diminuer leur immunogénicité et permettre l'échappement à l'immunosurveillance par les cellules NK (Kopp et al., 2009).

3.2. Altérations des cellules NK en contexte tumoral : de la dysfonction à l'exhaustion ?

Les interactions des cellules NK avec la tumeur et le microenvironnement tumoral induisent progressivement un dérèglement de la balance entre signaux activateurs et signaux inhibiteurs, pouvant mener *in fine* à une **dysfonctionnalité** de ces dernières. Par exemple, le transfert adoptif de cellules NK allogéniques provenant de donneurs sains suffit à restaurer une réponse anti-tumorale efficace, illustrant une certaine perte d'efficacité des cellules NK chez les patients en contexte tumoral

(Chansac et al., 2005; Delconte et al., 2016). Cet état est défini par l'**altération** des capacités d'**activation**, de **survie**, de **prolifération** ou de mise en place des **fonctions effectrices** des cellules NK suite à une stimulation trop intense ou chronique. Cette perte de fonctionnalité des cellules NK a été observée en **contexte tumoral** dans des modèles précliniques et chez l'Homme (Platonova et al., 2011), mais également en contexte d'**infection virale chronique**, favorisant ainsi l'échappement de la tumeur et la persistance virale respectivement (Sun et al., 2012; Varchetta et al., 2012; Lichtfuss et al., 2012).

Ces altérations sont observées à la fois sur les cellules NK intra-tumorales et périphériques, suggérant la possibilité d'une altération systémique de ces dernières. Dans d'autres études, ce dysfonctionnement est restreint aux cellules NK intra-tumorales (Platonova et al., 2011; Zheng et al., 2019). L'identification et la compréhension de ces voies d'échappement à la réponse immunitaire médiée par les cellules NK est un champ de recherche très dynamique et prometteur pour le développement de nouvelles thérapies anti-cancéreuses.

3.2.1. Altérations de l'expression des récepteurs activateurs et inhibiteurs

Comme pour les ligands sur les cellules tumorales, l'expression des récepteurs inhibiteurs et activateurs à la surface des cellules NK est largement altérée en contexte tumoral.

Tout d'abord, l'expression des récepteurs activateurs tels que **NKp30**, **NKp44**, **NKp46**, **NKG2D** ou **DNAM1** est diminuée à la surface des cellules NK dans les cancers du sein (Mamessier et al., 2011), de l'ovaire (Carlsten et al., 2009), les cancers cervicaux (Garcia-Iglesias et al., 2009), les cancers du pancréas, gastriques et colorectaux (Peng et al., 2013), les myélomes multiples (Guillerey et al., 2015b), les leucémies aiguës et chroniques (Sanchez-Correa et al., 2012; Parry et al., 2016) ainsi que dans les atteintes lymphoprolifératives (Wiesmayr et al., 2012). Cette diminution d'expression des récepteurs activateurs est généralement associée à une cytotoxicité réduite et corrèle avec la progression tumorale (Carlsten et al., 2009; Garcia-Iglesias et al., 2009). Enfin, de nombreuses études rapportent une diminution voire une perte d'expression du **CD16** sur les cellules NK infiltrant les tumeurs, suggérant ainsi l'inhibition de leur capacité à réaliser l'ADCC (Schleypen et al., 2006; Carrega et al., 2008; Carlsten et al., 2009).

A l'inverse, l'expression du récepteur inhibiteur **NKG2A** est augmentée à la surface des cellules NK isolées chez des patients atteints de leucémies myéloïdes aiguës (Stringaris et al., 2014), de cancers du foie (Sun et al., 2017), de myélome multiple (Benson et al., 2011) et est généralement associée à un mauvais pronostic.

Les récepteurs de la famille des ICP sont également plus exprimés à la surface des cellules NK en contexte tumoral. Par exemple, l'expression de **TIGIT**, **CD96**, **TIM-3** et **LAG-3** a été rapportée sur les cellules NK dans des modèles murins de cancer du poumon, du côlon, du sein ou de mélanome et est associée à leur dysfonctionnement (Ohs et al., 2017; Zhang et al., 2018b). Chez les patients atteints de mélanome et de cancers du foie, l'augmentation de l'expression de **TIM-3** ou de **CD96** à la surface des cellules NK corrèle avec le stade tumoral et un mauvais pronostic (da Silva et al., 2014; Sun et al., 2019). Par ailleurs, l'expression de **PD-1** sur les cellules NK a été observée chez des patients atteints de

myélome multiple (Benson et al., 2010), de lymphomes (Wiesmayr et al., 2012), de carcinome rénal (MacFarlane et al., 2014), de sarcome de Kaposi (Beldi-Ferchiou et al., 2016) ou de cancers de l'ovaire (Pesce et al., 2017) et a été associée à une perte de fonction des cellules NK. En accord avec cette observation, le blocage de l'axe **PD-1/PD-L1** par des anticorps antagonistes augmente l'activité cytotoxique des cellules NK envers des cellules primaires de myélome (Benson et al., 2011; Vari et al., 2018) et participe à restaurer une immunité anti-tumorale efficace dans divers modèles murins (Hsu et al., 2018). Toutefois, l'expression de PD-1 par les cellules NK reste à ce jour très controversée et serait relativement faible par rapport à l'expression sur les LT CD8⁺ et par rapport à l'expression d'autres ICP tels que CD96, TIM-3, LAG-3 ou encore TIGIT (Judge et al., 2020; Zhang et al., 2018b). Ainsi, il a été observé que l'inhibition de la voie PD-1/PD-L1 ne suffit pas à restaurer l'activité anti-tumorale des cellules NK dans des modèles murins de cancers du sein, du colon ou de mélanome, probablement en raison de l'existence d'autres mécanismes inhibiteurs (Zhang et al., 2018b). Enfin, très récemment, il a été observé que l'expression de l'ICP **CD73** est augmentée à la surface d'une sous-population de cellules NK intra-tumorales isolées chez des patientes atteintes de cancer du sein (Neo et al., 2020). Ces cellules NK CD73⁺ participent au maintien d'un environnement immunosuppresseur via la génération d'**adénosine** mais également via la production accrue d'**IL-10** et de **TGF-β** en grande quantité et sont associées à une augmentation de la croissance tumorale. En outre, bien que l'expression de **KLRG1** sur les cellules NK est augmentée en réponse à leur stimulation chronique *in vitro* et a été associée à une diminution de leurs fonctions en contexte d'infection chronique par le virus de l'hépatite C, son rôle dans la régulation de l'activité des cellules NK en contexte tumoral reste encore à démontrer (Alvarez et al., 2019b; Wang et al., 2013; Tata and Brossay, 2018).

Comme décrit précédemment pour les cellules tumorales, ces modifications ne sont pas exclusives et peuvent intervenir de concert pour limiter l'activation des cellules NK. Par exemple, la perte de **NKp46** est associée à une augmentation d'expression des récepteurs inhibiteurs tels que **NKG2A** chez les patients atteints de carcinome rénal ou de leucémie myéloïde aigue (AML) et corrèle avec la probabilité de rechute dans l'AML (Schleypen et al., 2003; Stringaris et al., 2014). Des observations similaires ont été réalisées dans le cancer du sein, où la perte d'expression de **NKp30**, **NKG2D**, **DNAM-1** et **CD16** sur les cellules NK infiltrantes est associée à l'augmentation de **NKG2A** et corrèle avec la progression tumorale (Mamessier et al., 2011). L'expression concomitante d'un ensemble de récepteurs inhibiteurs et d'ICP définit ainsi des cellules NK dont les fonctions sont lourdement altérées (Seo et al., 2017; Zhang et al., 2018b; Neo et al., 2020).

L'acquisition de récepteurs inhibiteurs des signaux cytokiniques peut également inhiber l'activation des cellules NK en contexte tumoral. Par exemple, il a été décrit que l'**IL-1R8**, co-récepteur de l'IL-37, peut également interagir avec l'IL-18 pour agir comme récepteur antagoniste et inhibe l'effet anti-tumoral de cette dernière sur la tumeur primaire dans des modèles d'hépatocarcinomes ainsi que sur le développement de métastases pulmonaires et hépatiques (Molgora et al., 2017).

3.2.2. Altérations de la différenciation et de la survie des cellules NK

Dans certains cas, malgré une expression en apparence normale des récepteurs activateurs et inhibiteurs à la surface des cellules NK, leur fonction est altérée, suggérant l'existence de mécanismes alternatifs. Récemment, l'étude par spectro-cytométrie de masse (**Cy-TOF**) des populations immunitaires innées infiltrant les tumeurs du poumon a mis en évidence une diminution drastique du nombre et de la fonction des cellules NK, et ce dès les stades précoces de la tumorigénèse (Lavin et al., 2017).

Ainsi, les voies de différenciation et de maturation des cellules NK peuvent être altérées en contexte tumoral. Tout d'abord, la **diminution** du nombre de cellules stromales **IL-15R α ⁺** dans la moelle dans des modèles murins de mélanome, de cancer du côlon ou du sein est associée à l'augmentation du nombre de cellules NK **immatures** incapables de sécréter de l'IFN- γ (Richards et al., 2006). Par ailleurs, plusieurs études ont rapporté la diminution de l'expression d'**Eomes** dans les cellules NK en réponse à une stimulation chronique ou en contexte tumoral (Alvarez et al., 2019b; Gao et al., 2017; Felices et al., 2018). En effet, suite à un transfert adoptif de cellules NK chez des souris porteuses de tumeurs, la perte d'expression de **Tbet** et **Eomes** corrèle avec la perte de fonction de ces dernières (Gill et al., 2012). La perte d'expression d'**Eomes** a également été associée à une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire, induisant ainsi la sénescence des cellules NK (Felices et al., 2018). Enfin, la perte d'expression d'**Eomes** par les cellules NK intra-tumorales et l'acquisition concomitante de l'expression de **CD49a** induit leur conversion en **ILC1** qui perdent l'activité anti-tumorale et anti-métastatique normalement assurée par les cellules NK (Gao et al., 2017). La prolifération et la survie de cellules NK peuvent également être diminuées en contexte tumoral. Par exemple, l'augmentation d'expression de l'E3 ubiquitine ligase **Clb-b** induit l'adressage des récepteurs de type « tyrosine kinases » **Axl**, **Tyro3** et **Mertk** au protéasome pour leur dégradation, limitant ainsi la prolifération et la survie des cellules NK. De manière corolaire, la perte génétique ou fonctionnelle de Clb-b permet de ré-activer l'activité anti-métastatique des cellules NK dans des modèles de tumeurs du sein et de mélanome chez la souris (Paolino et al., 2014). De la même manière, la protéine **CIS**, acquise à la surface des cellules NK en réponse à l'IL-15, est capable d'induire la dégradation de **JAK1** par le protéasome, limitant ainsi la propagation du signal activateur médié par l'IL-15. Les souris déficientes pour l'expression de CIS sont résistantes au développement de métastases via un mécanisme dépendant des cellules NK dans des modèles de mélanome, de cancers de la prostate et du sein (Delconte et al., 2016).

Enfin, les cellules NK en contexte tumoral présentent également des **altérations métaboliques** qui limitent directement leur survie, leur prolifération ainsi que leurs fonctions effectrices. Par exemple, elles sont caractérisées par une **respiration mitochondriale**, un **métabolisme des acides gras** et une **glycolyse** altérés (Felices et al., 2018; Cong et al., 2018; Slattery et al., 2019). Les cellules NK intra-tumorales sont également caractérisées par des mitochondries plus petites et fragmentées et cette caractéristique a été associée à une diminution de leur cytotoxicité et de leur survie *in vitro* et corrèle avec un mauvais pronostic chez les patients atteints de cancer du foie (Zheng et al., 2019). Ces altérations métaboliques sont notamment induites en réponse à l'activation constante de la voie **mTOR** sous l'influence du microenvironnement tumoral (Felices et al., 2018; Zheng et al., 2019).

3.2.3. Mécanismes impliqués dans l'altération des cellules NK en contexte tumoral

Les mécanismes impliqués dans la mise en place des altérations observées dans les cellules NK en contexte tumoral sont divers. Tout d'abord, la stimulation chronique des cellules NK induit directement un rétro-contrôle négatif de leur activation via la mise en place de mécanismes **intrinsèques**, ne nécessitant pas l'intervention d'autres partenaires. Ainsi, la **stimulation chronique** par l'**IL-15** induit directement une **diminution** de l'expression de son propre récepteur ainsi que des **récepteurs activateurs** (Felices et al., 2018) mais également une augmentation de la protéine **CIS** capable de bloquer la voie de signalisation en aval de l'IL-15 en induisant la dégradation de la protéine JAK1 (Delconte et al., 2016). Une perte de cytotoxicité des cellules NK suite à l'**épuisement du stock de granules cytotoxiques** a également été observée *in vitro* mais cet état transitoire peut rapidement être restauré en réponse à l'IL-2 (Topham and Hewitt, 2009). Par ailleurs, les leucémies lymphoïdes chroniques (LLC) localisées en périphérie sont caractérisées par une forte immunosuppression associée

à un épuisement des cellules NK périphériques, contrairement aux lymphomes chroniques à petites cellules (SLL), pathologie de même origine mais plutôt localisée dans les ganglions où cette immunosuppression est moindre (Parry et al., 2016). Ces résultats sont en faveur d'un modèle où la stimulation chronique des cellules NK par le contact direct avec les cellules tumorales dans le sang est à l'origine de profondes modifications phénotypiques et fonctionnelles. La perte des fonctions des cellules NK en contexte tumoral est également induite directement par le contact avec les cellules tumorales, et ce de manière graduelle, avec une perte des fonctions sécrétrices puis cytotoxiques dès les stades précoces de la tumorigénèse (Gill et al., 2012; Cong et al., 2018). Par exemple, la perte d'expression de **DNAM1** est directement induite par l'expression aberrante de **PVR (CD155)** à la surface des cellules tumorales (Sanchez-Correa et al., 2012). Une preuve supplémentaire que cet état est directement induit par la tumeur et son microenvironnement est la réversion des caractéristiques phénotypiques d'épuisement des cellules NK périphériques après retrait de la tumeur par intervention chirurgicale (Mamessier et al., 2011; MacFarlane et al., 2014).

En lien avec les observations précédentes, le microenvironnement immunosuppresseur favorise l'altération des cellules NK. Ainsi, la présence de cellules immunosuppressives telles que les **Tregs**, **MDSCs** (cellules myéloïdes suppressives) ou encore les **macrophages** est inversement corrélée avec le nombre de cellules NK fonctionnelles (Ghiringhelli et al., 2005; Li et al., 2009; Peng et al., 2017). Par ailleurs, le **TGF-β** sécrété par les Tregs, la cellule tumorale elle-même, les plaquettes ou exprimé à la surface des MDSCs inhibe l'expression de **NKG2D** et **NKp30** à la surface des cellules NK *in vitro* mais également chez les patients atteints de cancer du poumon, du côlon ou de gliomes (Kopp et al., 2009; Li et al., 2009; Flavell et al., 2010; Lee et al., 2004; Crane et al., 2010). Le **TGF-β** va également directement inhiber l'activité anti-tumorale des cellules NK, en inhibant l'expression de **granzyme**, la production d'**IFN-γ** via la diminution d'expression de **Eomes** et **T-bet**, favorisant ainsi la croissance tumorale et le développement de métastases (Rook et al., 1986; Laouar et al., 2005; Smyth et al., 2006; Peng et al., 2017; Trotta et al., 2008; Viel et al.; Sun et al., 2019) ou en induisant leur conversion en ILC1 dépourvues de propriétés anti-tumorales (Gao et al., 2017). Enfin, le **TGF-β** peut également impacter l'infiltration des cellules NK dans les tumeurs en modifiant directement leur répertoire de **récepteurs aux chimiokines** (Castriconi et al., 2013). A l'inverse, le blocage du TGF-β permet de restaurer la cytotoxicité des cellules NK dans un modèle de co-culture avec des cellules tumorales (Wilson et al., 2011).

D'autres molécules exprimées ou sécrétées en contexte tumoral, telles que l'indoléamine 2,3 dioxygénase (**IDO**), la prostaglandine E2 (**PGE2**), l'**IL-6** nuisent également à l'efficacité des cellules NK (Mamessier et al., 2011; Pietra et al., 2012; Böttcher et al., 2018; Cifaldi et al., 2015; Balsamo et al., 2013; Sarkar et al., 2013). Enfin, les conditions environnementales telles que l'**hypoxie** ou la **diminution des nutriments** sont également impliquées dans l'altération des cellules NK (Sarkar et al., 2013; Zheng et al., 2019).

In vitro, cet état peut être partiellement reversé par traitement avec de l'IL-2, de l'IL-15 ou de l'IL-21 ou par la sur-expression de T-bet (Topham and Hewitt, 2009; Beldi-Ferchiou et al., 2016; Seo et al., 2017; Gill et al., 2012). *In vivo*, les anticorps bloquant les points de contrôles inhibiteurs de la réponse immunitaire tels que PD-1, TIM-3 ou TIGIT ainsi que le traitement par l'IL-21 permettent de lever le défaut d'activation des cellules NK et de restaurer leurs fonctions anti-tumorales (Gallois et al., 2014; Pesce et al., 2017; da Silva et al., 2014; Zhang et al., 2018b; Seo et al., 2017). En accord avec ces observations, le blocage du TGF-β *in vitro* et *in vivo* restaure les fonctions effectrices et anti-tumorales des cellules NK (Kopp et al., 2009; Peng et al., 2017; Nam et al., 2008). Toutefois, dans une autre étude, l'inhibition de la voie PD-1/PD-L1 ne permet pas de restaurer complètement la fonctionnalité des cellules NK, potentiellement à cause de l'existence d'autres mécanismes inhibiteurs (Wiesmayr et al., 2012).

3.2.4. De la dysfonction à l'exhaustion ?

Le concept d'exhaustion des cellules immunitaires, largement étudié chez les **LT** et plus récemment décrit pour les **LB**, est aujourd'hui revisité pour les **cellules NK** (Wherry and Kurachi, 2015; Blank et al., 2019; Moir and Fauci, 2014; Khoder et al., 2018)

Bien que la limite entre inhibition et épuisement soit difficile à définir et appelle à une certaine précaution quant à l'emploi de ces concepts, la notion d'**irréversibilité** semble intrinsèquement liée au concept d'exhaustion. Dans les LT considérés comme épuisés, des **altérations épigénétiques et transcriptionnelles** ont été identifiées et assurent l'expression d'un programme transcriptionnel différent de celui des cellules effectrices qui affecte l'état des cellules de manière durable (Shin et al., 2009; Shih et al., 2014; Wherry and Kurachi, 2015). De manière similaire, les cellules NK chroniquement stimulées et dysfonctionnelles présentent des altérations épigénétiques similaires à celles observées pour les LT (Lau et al., 2018; Merino et al., 2019). De manière intéressante, la perte d'expression d'**Eomes** en réponse à une stimulation chronique a directement été reliée à la présence de **dommages à l'ADN**, suggérant que la dysfonctionnalité des cellules NK peut être due à des dommages irréversibles (Alvarez et al., 2019b). Bien que l'origine des cellules T « épuisées » commence à être déchiffrée, l'ontogénie des cellules NK dysfonctionnelles reste encore largement non définie. Certaines observations sont en faveur d'un modèle linéaire de différenciation à partir de la stimulation chronique des cellules **CD56^{dim} CD57⁺ KIR⁺** terminalement différenciées (Beldi-Ferchiou et al., 2016). La caractérisation des cellules NK épuisées et la compréhension de leur origine en contexte tumoral nécessitera ainsi d'établir en détail leur profil transcriptionnel et épigénétique associé à leur profil fonctionnel et phénotypique par rapport aux cellules NK dysfonctionnelles.

4. Cellules NK et thérapies anti-tumorales

Le développement et l'avènement en clinique des **immunothérapies** pour le traitement de certains cancers constituent une véritable révolution, avec un bénéfice clinique considérable sur la survie des patients dans certains cancers. Malheureusement, à ce jour, l'efficacité de ces immunothérapies est restreinte à certains sous-types de cancer et certains patients dits « répondeurs » (environ 30%). Ainsi, il est crucial de continuer à développer de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant le système immunitaire (Seidel et al., 2018). Bien que les premières immunothérapies développées ciblent plutôt les cellules de l'immunité adaptative (anticorps ciblant les ICP PD-1 et CTLA-4 exprimés sur les LT), on observe un intérêt grandissant pour le ciblage des cellules de l'immunité innée. En effet, au-delà de représenter une cible supplémentaire, leurs fonctions anti-tumorales sont indépendantes de la spécificité antigénique, leur conférant ainsi un avantage considérable sur les LT et LB dont on estime que seulement 0.001 à 10% sont spécifiques des néoantigènes tumoraux (Linnemann et al., 2013). Ainsi, la cytotoxicité naturelle des cellules NK envers les cellules tumorales peut être exploitée et amplifiée par de nombreuses approches thérapeutiques afin de ré-activer une immunité anti-tumorale efficace et durable. Ces thérapies peuvent cibler directement la cellule NK ou indirectement via le ciblage du microenvironnement tumoral. Qu'elles soient déjà utilisées en clinique pour certaines ou au stade de développement voire d'évaluation pour d'autres, les différentes thérapies reposant sur les cellules NK sont présentées dans le paragraphe suivant et dans la **figure 12**. A titre d'information, les essais cliniques en cours pour certaines de ces thérapies seront mentionnés avec le numéro de référence (NTxxxxxxx ; <http://clinicaltrials.gov>).

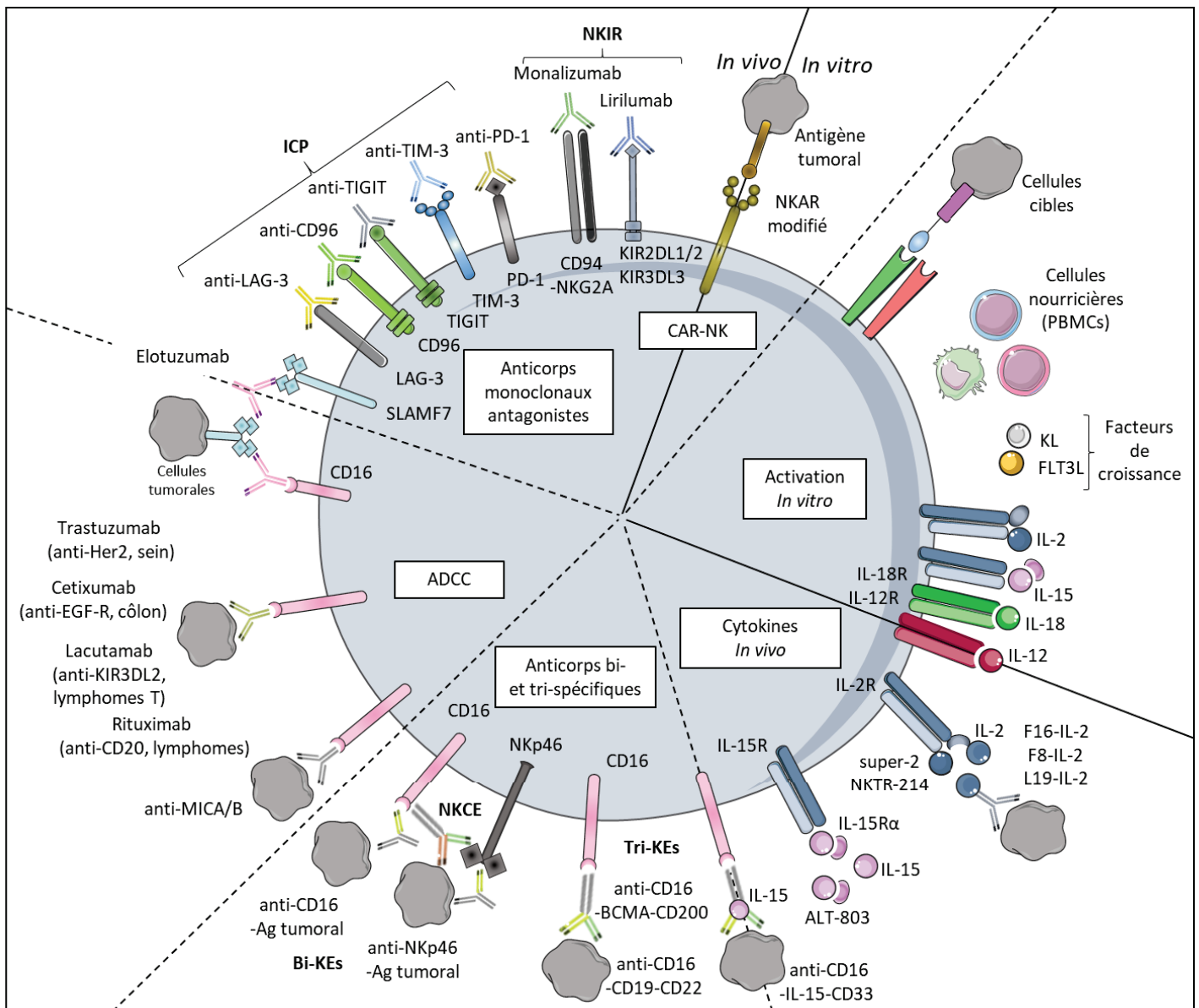


Figure 12. Stratégies thérapeutiques anti-tumorales ciblant les cellules NK

Des stratégies thérapeutiques de plus en plus nombreuses et variées permettent de cibler les cellules NK et leur activité anti-tumorale. Ces stratégies visent à lever les signaux inhibiteurs ou à induire des signaux activateurs. Elles peuvent être mises en œuvre directement *in vivo* ou *in vitro* avant ré-infusion chez les patients. Elles peuvent être combinées entre elles ou avec d'autres thérapies ciblant le système immunitaire ou la cellule tumorale directement. ADCC: Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity, BiKEs: Bi-specific Killer Engagers, CAR-NK: Chimeric Activating Receptor NK cells, ICP: Immune CheckPoints, NKCE: Natural Killer Cell Engagers, NKIR: NK cells Inhibitory Receptors, PBMcs: Peripheral Blood Mononuclear Cells, TriKEs: Tri-specific Killer Engagers.

4.1. Modulation *in vivo* des cellules NK

4.1.1. Ciblage par des anticorps

a) Anticorps agonistes et antagonistes monovalents ciblant les cellules NK

Au cours de ces dernières décennies, un ensemble d'anticorps humains ou humanisés ciblant les récepteurs activateurs ou inhibiteurs pour moduler l'activité des cellules NK *in vivo* ont vu le jour.

Tout d'abord, l'anticorps agoniste humanisé **Elotuzumab** cible le récepteur activateur **SLAMF7** à la fois exprimé sur les cellules NK et sur les cellules transformées activant ainsi directement les cellules NK mais permettant également le rapprochement avec la cellule tumorale cible. Cet anticorps a été approuvé par les administrations de santé aux Etats-Unis (Food and Drug Administration, FDA) puis en Europe (European Medicines Agency, EMA) en 2015 et 2016 respectivement et est actuellement utilisé en clinique pour le traitement des myélomes multiples (Lonial et al., 2015). Des études *in vitro* ainsi que cliniques sont en cours pour évaluer son efficacité dans d'autres cancers ainsi que le bénéfice de son utilisation en combinaison avec d'autres stratégies thérapeutiques, avec des résultats préliminaires encourageants (Bezman et al., 2017).

Plus récemment développé, le **Lirilumab** est une immunoglobuline de type IgG4 qui agit comme antagoniste des KIRs inhibiteurs **KIR2DL1**, **KIR2DL2** et **KIR3DL3**. Un effet thérapeutique bénéfique du traitement par Lirilumab a été observé chez la souris dans des modèles pré-cliniques d'AML, de lymphome B en combinaison avec le Rituximab (anti-CD20) et dans le myélome en combinaison avec du lénalidomide (immuno-modulateur) (Benson et al., 2011; Romagné et al., 2009). Toutefois, les résultats cliniques sont plus modérés, avec une absence d'effet significatif sur la survie des patients atteints d'AML traités par Lirilumab en monothérapie. De manière intéressante, une tendance positive est observée dans le groupe ayant reçu une dose plus faible de Lirilumab, suggérant un possible effet de dé-sensibilisation des cellules NK stimulées chroniquement avec de fortes doses d'anticorps antagonistes (étude clinique **EFFIKIR**, NCT01687387). Considérant l'effet bénéfique non négligeable dans les modèles murins, de nombreux essais cliniques sont en cours afin de conclure sur l'efficacité de la combinaison de Lirilumab avec d'autres thérapies chez les patients atteints d'AML, de syndromes myélodysplasiques (MDS), de myélome multiple et de lymphomes T et B. Ces essais cliniques devraient également permettre d'évaluer si la stimulation chronique des KIRs peut induire l'anergie des cellules NK pour permettre *in fine* d'établir le schéma thérapeutique optimal.

Dans la même catégorie, le **Monalizumab**, anticorps antagoniste de classe IgG4, ciblant le récepteur inhibiteur **NKG2A** a montré une efficacité *in vitro* et *in vivo* sur l'activation des fonctions effectrices des cellules NK. Il permet également de restaurer l'activité des **LT CD8⁺** cytotoxiques en combinaison avec des inhibiteurs de la voie PD-1/PD-L1 (McWilliams et al., 2016; André et al., 2018). Des essais cliniques sont en cours pour évaluer le bénéfice du Monalizumab en combinaison avec le Durvalumab (anti-PD-L1) ou le Cetuximab (anti-EGFR) pour le traitement de cancers solides ou de tumeurs H&N respectivement.

Enfin, de par leur expression de **PD-1**, les cellules NK peuvent également participer à l'effet anti-tumoral médié par les anticorps ciblant cet ICP utilisés en clinique, levant ainsi l'inhibition sur les fonctions effectrices des cellules NK (Hsu et al., 2018; Dong et al., 2019). De même, le blocage des ICP tels que **Tim-3**, **TIGIT**, **CD96** ou encore **LAG-3**, seuls ou en combinaison avec d'autres stratégies thérapeutiques, permet de lever l'inhibition de la réponse anti-tumorale médiée par les cellules NK dans des modèles murins pré-cliniques de mélanome (Baghdadi et al., 2013; da Silva et al., 2014; Zhang et al., 2018b; Chan et al., 2014; Merino et al., 2019). Toutefois, le bénéfice clinique de ces ICP nouvellement caractérisés n'a pas encore été évalué.

b) Activation de l'ADCC

Il a été démontré qu'un certain nombre d'anticorps monoclonaux de type IgG ciblant la cellule tumorale et utilisés en clinique sont reconnus par les cellules NK via **CD16**, pouvant ainsi induire l'ADCC. Par exemple, l'efficacité du **Rituximab**, du **Trastuzumab** ou du **Cetuximab**, anticorps monoclonaux ciblant respectivement **CD20** (lymphomes B), **Her2** (cancer du sein) ou **EGFR** (cancers colorectaux et de la tête et du cou) est largement médiée par leur capacité à recruter les cellules NK qui vont lyser spécifiquement les cellules tumorales (Cooley et al., 1999; Clynes et al., 2000; Cartron et al., 2002; Beano et al., 2008). De manière intéressante, l'**Elotuzumab** présenté précédemment, en plus de son action directe sur les cellules NK, permet également la reconnaissance et la lyse par ADCC des cellules tumorales par les cellules NK activées (Campbell et al., 2018; Collins et al., 2013). Plus récemment, il a été démontré que des anticorps ciblant **MICA** et **MICB** utilisés pour empêcher la dégradation de ces ligands de **NKG2D** à la surface des cellules tumorales sont également reconnus par **CD16** et induisent la lyse par ADCC de ces dernières (Ferrari de Andrade et al., 2018). De manière similaire, l'anticorps **IPH4301**, ciblant également **MICA** et **MICB**, mobilise les fonctions d'ADCC des cellules NK, tout en limitant la perte d'expression de **NKG2D** liée à l'expression de ces ligands sur la cellule tumorale. Cet anticorps est en cours d'homologation afin de pouvoir débiter son évaluation pré-clinique chez les patients (<https://www.innate-pharma.com/fr/produits/iph43-anticorps-conjugué-anti-mica/b-first-class>).

Enfin, tout récemment développé, le **Lacutamab** est un anticorps humanisé de classe IgG1 ciblant le récepteur inhibiteur **KIR3DL2** exprimé par les cellules NK mais également par les cellules tumorales de **lymphomes T** cutanés (entre 65% et 85% des patients selon le sous-type) et dont l'expression est associée à un mauvais pronostic (Bagot et al., 2001; Marie-Cardine et al., 2014; Battistella et al., 2016; Hurabielle et al., 2017; Battistella et al., 2017). Ainsi, en reconnaissant KIR3DL2 sur les cellules tumorales, le Lacutamab permet le recrutement des cellules NK via **CD16** et l'activation de leur fonction d'**ADCC**. Son efficacité est en cours d'évaluation dans l'essai clinique **TELOMAK** de phase II, en monothérapie ou en combinaison avec une chimiothérapie standard, pour le traitement de lymphomes T cutanés avancés (Van Der Weyden et al., 2018; Bagot et al., 2019).

Les objectifs futurs de ces thérapies résident dans le développement de nouvelles générations d'anticorps capables d'induire l'ADCC de manière plus robuste, mais également d'identifier les médiateurs pouvant induire ou augmenter l'expression de CD16 à la surface des cellules NK d'une part et des antigènes à la surface de la cellule tumorale d'autre part (Robak and Robak, 2011; Monnet et al., 2014; Michaud et al., 2014; Berdeja et al., 2007; Dahl et al., 2011; Mankaï et al., 2009; Kohrt et al., 2012). Enfin, de manière générale, l'identification de nouveaux antigènes tumoraux pouvant être spécifiquement ciblés par des anticorps pour induire l'ADCC est un domaine de recherche en plein essor et prometteur.

c) Nouvelles générations : Bi-KEs, Tri-KEs et NKCE

Avec l'objectif constant d'augmenter la spécificité des thérapies afin de limiter les effets secondaires chez les patients, le développement d'anticorps à spécificité multiple (**bi-spécifiques** ou **tri-spécifiques**) permettant un adressage des cellules NK effectrices directement à la cellule tumorale,

s'est accentué ces 20 dernières années. Ainsi, des **Bi-KEs** pour « Bi-specific Killer Engagers » sont en cours de développement et d'évaluation, avec des résultats préliminaires encourageants pour le traitement de certains lymphomes (NCT02321592, phase II ; NCT02665650, phase I ; NCT03192202 phase I/II). Ces Bi-KEs ciblent d'une part un antigène tumoral (**CD33**, **CD30**, **CD19**, **CD22**, **EGFR**, **BCMA**, **ErbB2**, **EpCAM**, **HER2**) et d'autre part les récepteurs des cellules NK tels que **CD16** ou **NKp46**, permettant ainsi le recrutement des cellules NK dans la tumeur et la lyse spécifique des cellules tumorales par ADCC ou cytotoxicité classique (Gleason et al., 2014; <https://www.affimed.com/rock-platform/innate-cell-engagers/>). Par ailleurs, un Bi-KE constitué de deux fragments variables ciblant à la fois l'antigène tumoral **CD33** et le récepteur **CD16**, reliés entre eux par une région codant l'**IL-15** est en cours d'évaluation. Les premiers résultats *in vitro* et *in vivo* de l'évaluation de cette « immunocytokine » montrent une survie et une prolifération accrue des cellules NK anti-tumorales par rapport au Bi-KEs correspondant, et un essai clinique de phase I est actuellement en cours pour évaluer le bénéfice de leur utilisation sur les tumeurs exprimant l'antigène CD33 (Vallera et al., 2016; NCT03214666). En parallèle, des anticorps tri-spécifiques ou **Tri-KEs** sont également en cours de développement. Par exemple, des Tri-KEs constitués de trois fragments variables permettant ainsi de cibler deux antigènes tumoraux de manière concomitante (**CD19/CD22** ou **BCMA/CD200**) d'une part, et le récepteur **CD16** d'autre part sont en cours de développement (Gleason et al., 2012; Gantke et al., 2017). Enfin, un anticorps tri-spécifique engageant CD16, NKp46 et dirigé contre un antigène tumoral (appelé **NKCE** pour « trifunctional specific NK cell engagers ») a également prouvé son efficacité contre l'implantation de lymphomes B *in vitro* et *in vivo* dans des modèles murins de tumeurs solides et de métastases (Gauthier et al., 2019).

4.1.2. Utilisation de cytokines *in vivo*

De par son effet sur la prolifération et l'activité des cellules NK, mais également des LT et des LB, l'**IL-2** a été la première cytokine approuvée par la FDA pour le traitement de certains patients atteints de cancer rénal métastatique et de mélanome à des stades avancés (Rosenberg et al., 1987; Weiss et al., 1992; Atkins et al., 1999; Rosenberg, 2014). Toutefois, son effet puissant sur l'activation des Tregs, qui expriment le récepteur IL-2R α de haute affinité de manière constitutive, ainsi que sa forte toxicité chez les patients limitent son efficacité et son utilisation clinique. Le développement de formes modifiées de l'IL-2 permettant de limiter ses effets sur les Tregs et sa toxicité, en fonctionnant indépendamment de IL-2R α tout en favorisant l'interaction avec le récepteur IL-2R β (**super-2** ou **NKTR-214**) ou grâce à des formes modifiées couplées à des anticorps permettant un adressage de l'IL-2 directement vers la tumeur (**F16-IL-2**, **F8-IL-2** ou **L19-IL-2**, également appelées « immunocytokines ») ont montré des effets prometteurs dans de nombreux modèles tumoraux chez la souris, seules ou en association avec d'autres stratégies thérapeutiques telles que les inhibiteurs d'ICP (Levin et al., 2012; Charych et al., 2016; Mårilind et al., 2008; Pedretti et al., 2010; Gutbrodt et al., 2013; Carnemolla et al., 2002; Wagner et al., 2008; Balza et al., 2010; Hutmacher et al., 2019; Ardolino et al., 2014). A titre d'exemple, les résultats préliminaires de l'étude clinique de phase I/II pour NKTR-214 sont prometteurs pour le traitement du mélanome et du cancer rénal en combinaison avec des ICP ou des inhibiteurs de tyrosine kinases (TKIs) ([NCT02983045](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02983045)).

L'**IL-15**, contrairement à l'IL-2, signale via IL-15R α en lieu et place de la chaîne IL-2R α , et tire donc son intérêt via un effet spécifique sur l'expansion et l'activation des cellules NK sans effet subsidiaire sur les Tregs (Szczepanski et al., 2011; Wagner et al., 2017). Elle permettrait également une activation plus durable en activant les voies mTOR et de nombreux gènes liés au métabolisme (Mao et al., 2015). Ainsi, de nombreux essais cliniques évaluant son efficacité dans le traitement de divers cancers ont été initiés. Dans ces études, l'IL-15 est évaluée sous sa forme native ou modifiée pour co-

exprimer la sous unité **IL-15R α** (forme appelée **ALT-803**) (Wrangle et al., 2018). Elle est évaluée en monothérapie ou associée avec des anticorps ciblant la tumeur ou son microenvironnement immunitaire (Mortier et al., 2006; Rubinstein et al., 2006; Chertova et al., 2013; Kermer et al., 2012; Vincent et al., 2014; Beffinger et al., 2018). Sous sa forme native, l'IL-15 a montré une efficacité modérée chez certains patients, avec toutefois des effets secondaires importants pour un grand nombre de patients (NCT01021059). Les formes modifiées, présentant une activité augmentée et généralement plus localisée, ont montré des effets prometteurs avec une efficacité accrue et une toxicité réduite *in vivo* et chez les patients atteints de cancers du poumon (Bessard et al., 2009; Wrangle et al., 2018, NCT02523469). Enfin, l'efficacité de l'IL-15 et ses dérivées est évaluée en utilisation prolongée par voie intraveineuse (NCT01572493) ou par bolus par voie sous-cutanée pour limiter l'épuisement des cellules NK (NCT01727076) (Felices et al., 2018).

D'autres cytokines activatrices des cellules NK *in vitro* telles que l'**IL-12** ou l'**IL-18** sont actuellement en cours d'évaluation pré-clinique, avec des résultats encourageants sur leur capacité à revigorer les cellules NK en contexte tumoral dans des modèles murins, en combinaison ou non avec des thérapies anti-ICP, mais malheureusement encore peu convaincants chez les patients (Coughlin et al., 1998; Ardolino et al., 2014; Ohs et al., 2017). L'identification de nouvelles cytokines activatrices des cellules NK *in vitro* mais également *in vivo* constitue ainsi un enjeu clé et constitue l'objectif principal de mes travaux de thèse.

4.1.3. Ciblage du microenvironnement tumoral

L'activité des cellules NK *in vivo* peut également être indirectement modulée en ciblant le microenvironnement immunosuppresseur ou les cellules tumorales elles-mêmes.

Tout d'abord, l'utilisation d'inhibiteurs de **TGF- β 1** exprimé sur les cellules NK entre autres, permet de limiter l'effet immunosuppresseur du TGF- β et de restaurer l'expression de **NKG2D** et leur activité des cellules NK *in vivo* (Otegbeye et al., 2018). Dans ce contexte, les molécules **Galunisertib** et **Vactosertib** font l'objet de nombreux essais cliniques de phase I/II et de phase II/III évaluant leur efficacité, seules (tumeurs solides (NCT02160106) et syndrome myélodysplasique (NCT03074006), myélome multiple (NCT03143985)) ou en combinaison avec d'autres thérapies (TKIs (NCT02240433, NCT02178358 et NCT01246986), anti-androgènes (NCT02452008), chimiothérapie (NCT03206177, NCT02672475, NCT02688712, NCT01582269 et NCT01682187), radiothérapie (NCT02906397 and NCT02538471) ou inhibiteurs de PD-L1 (NCT02734160 and NCT02423343)).

L'**IDO** est une enzyme qui favorise un microenvironnement immunosuppresseur en agissant comme facteur trophique pour les Tregs et en induisant l'anergie des LT et des cellules NK par déprivation du milieu en tryptophane et par production de kynurénines immunosuppresseurs. Plus spécifiquement, l'IDO diminue également l'expression de **NKp46** et **NKG2D** sur les cellules NK et inhibe leur fonction cytotoxique en réponse aux ligands de ces récepteurs activateurs *in vitro* (Della Chiesa et al., 2006). Il a été décrit que l'**Epacadostat**, inhibiteur de l'IDO, induit entre autre une diminution des cellules NK immatures dans le sang des patients (Jochems et al., 2016). Les effets de ce traitement sur les cellules NK demeurent largement non caractérisés à ce jour et sont en cours d'évaluation pré-clinique et clinique; et les premiers résultats sont prometteurs pour le traitement des tumeurs solides, en combinaison avec d'autres thérapies telles que les TKIs, les molécules ciblant les ICP ou encore des chimiothérapies (Beatty, 2017 INCB024360).

Par ailleurs, certains traitements ciblant la cellule tumorale tels que les **agents alkylants**, les **inhibiteurs de la dé-acétylation des histones**, du **protéasome**, ou des **PI3Kinases** induisent un stress à l'origine de la diminution d'expression du CMH-1 et de l'augmentation de l'expression de ligands

activateurs des cellules NK (NKG2D-L ou DNAM-1-L) modifiant ainsi l'immunogénicité des cellules tumorales (Antonangeli et al., 2016; Schmutte et al., 2008; Niu et al., 2017; Bommarito et al., 2016).

Certains traitements peuvent avoir un effet immunomodulateur dit « off-target » c'est-à-dire hors cible. Par exemple, le **Lenalidomide**, qui induit l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose des cellules tumorales, inhibe également l'activité des **Tregs** et des **MDSCs** ce qui a pour effet d'augmenter l'expression des **NCRs** sur les cellules **NK** et de potentialiser leurs fonctions effectrices anti-tumorales (Yang et al., 2012; Zhang et al., 2013; Wu et al., 2008; Reddy et al., 2008; Hagner et al., 2017). Bien que les effets immunomodulateurs du Lenalidomide demeurent peu compris, ce traitement est actuellement approuvé pour les patients atteints de myélomes multiples, de lymphomes B des cellules du manteau et de MDS réfractaires ou en rechute (Dimopoulos et al., 2007; Palumbo et al., 2012; Habermann et al., 2009; Witzig et al., 2011; Goy et al., 2013; Zinzani et al., 2013; Ruan et al., 2015; Trněný et al., 2016). De la même manière, le **Dasatinib** (inhibiteur des tyrosines kinases de la famille Src) ou l'**Imatinib** (inhibiteur des kinases c-kit et PDGFR) induisent l'expansion des cellules NK entre autres, et leur efficacité est en cours d'évaluation clinique pour le traitement de tumeurs hématologiques après greffes de cellules souches (Borg et al., 2004; Ménard et al., 2009; Kim et al., 2009; Mustjoki et al., 2009; Kreutzman et al., 2010; Ohyashiki et al., 2012; Rea et al., 2013; Ilander et al., 2014). De manière corolaire, l'infiltration en cellules NK ainsi que leur phénotype avant, pendant et après le traitement par ces molécules est un marqueur prédictif de réponse au traitement et d'un pronostic favorable (Rusakiewicz et al., 2013; Zitvogel et al., 2016).

Enfin, des molécules agonistes de la voie **STING** stimulent indirectement les cellules NK en induisant la synthèse des **IFN de type I** dans la tumeur. En effet, Une récente étude montre que l'injection intratumorale de **cGAMP** favorise la production d'**IFN de type I** permettant l'augmentation des fonctions cytotoxiques des cellules NK impliquées dans le rejet des tumeurs RMA-S (Marcus et al., 2018). De manière intéressante, une autre étude récente montre que des dinucléotides cycliques (**CDN**) activateurs de la voie STING induisent une puissante réponse des cellules **NK** contre des cellules tumorales résistantes aux LT CD8⁺, également via les **IFN de type I** (Nicolai et al., 2020).

4.2. Manipulation *in vitro* des cellules NK

La manipulation *in vitro* des cellules NK poursuit trois grands objectifs : amplifier les cellules, maintenir leur survie et assurer un niveau d'activation suffisant pour permettre une activité anti-tumorale efficace sur le long terme. Ces objectifs nécessitent donc une compréhension fine des mécanismes de prolifération, de survie mais également d'épuisement et de mémoire des cellules NK.

4.2.1. Transfert adoptif de cellules NK primaires

La mise en évidence d'un rôle des cellules NK dans le succès des transplantations par induction d'un effet GvL responsable de l'élimination des cellules tumorales a ouvert la voie pour leur utilisation en infusion chez les patients après expansion *in vitro* (Ruggeri et al., 2002). La transfusion de cellules NK **autologues**, ayant l'avantage de ne pas induire de toxicité majeure chez les patients, a toutefois démontré une efficacité mineure sur l'amélioration de la survie à long terme, principalement à cause d'une inhibition par les protéines HLA du patient mais également en raison d'une **hyporéactivité** des cellules NK isolées chez les patients déjà traités et à des stades avancés de la maladie (Rosenberg et al., 1987; West et al., 1987; Fridman, 1987; Hercend et al., 1990; Burns et al., 2003; Ishikawa et al., 2004; Tarek et al., 2012). Ainsi, des stratégies basées sur l'infusion de cellules NK **allogéniques** issues

de donneurs sains haplo-identiques ont été développées et présentent des résultats mitigés. En effet, une efficacité non négligeable a été observée à court terme chez des enfants atteints de leucémies et en rechute après greffe de cellules souches et chez des patients atteints d'AML, de cancers du sein, de l'ovaire ou de lymphomes B non-Hodgkiniens (Koehl et al., 2004; Miller et al., 2005; Geller et al., 2011). Toutefois, l'efficacité à long terme de ces transfusions est limitée, ce qui peut s'expliquer notamment par une faible persistance et expansion des cellules *in vivo* et le développement d'un microenvironnement immunosuppresseur notamment via l'induction de **Tregs** qui prolifèrent en réponse aux injections d'**IL-2** concomitante pour amplifier les NK *in vivo* (Bachanova et al., 2010). Ainsi, des essais cliniques sont en cours pour évaluer l'effet de la déplétion d'IL-2 *in vivo* dans ce contexte (Bachanova et al., 2014; NCT00274846 and NCT01106950). De nombreuses stratégies sont donc en cours d'évaluation pour déterminer la source des cellules NK, les méthodes d'expansion ou le schéma thérapeutique optimal de ces infusions ; et seront discutées dans le dernier paragraphe.

4.2.2. Cellules NK génétiquement modifiées

Sur le modèle des LT porteurs de récepteurs antigéniques chimériques (Chimeric Antigen Receptor, **CAR-T cells**), la modification par manipulation génétique des récepteurs de surface des cellules NK dans le but d'améliorer leur spécificité et leur activation a été réalisée pour la première fois en 2002 et constitue un domaine en plein essor. Ces **CAR-NK** conçues pour exprimer à leur surface des récepteurs spécifiques d'antigènes tumoraux tels que **Her2** dans les cancers du sein (Uherek et al., 2002; Schönfeld et al., 2015); **CD19**, **CD20** ou **FLT3** pour les lymphomes B (Imai et al., 2005; Oelsner et al., 2017; Liu et al., 2020; Chu et al., 2015; Oelsner et al., 2019); **CD3**, **CD4** ou **CD5** pour les lymphomes T (Chen et al., 2016b; Pinz et al., 2017; Chen et al., 2017a); **CD33** ou **CD123** pour l'AML (Tang et al., 2018; Kerbaux et al., 2017); **EGFR/EGFRvIII** pour le glioblastome (Müller et al., 2015; Chen et al., 2016c; Murakami et al., 2018); **CD133** pour les cancers de l'ovaire (Klapdor et al., 2017) ou **BCMA** (Shah and Mailankody, 2020) pour le myélome multiple. Ainsi, elles acquièrent la capacité d'interagir directement avec les cellules tumorales pour induire leur lyse spécifique. Par ailleurs, des cellules CAR-NK sur-exprimant le récepteur activateur **NKG2D** ont montré une activité cytotoxique accrue envers des lignées tumorales *in vitro* et *in vivo* dans des modèles tumoraux murins ; et ont également été associées à une régression tumorale chez des patients atteints de cancers colorectaux métastatiques traités par infusion de cellules CAR-NK (Xiao et al., 2019).

Les cellules CAR-NK présentent de nombreux avantages par rapport à leurs homologues CAR-T. En effet, n'induisant pas d'effet GvHD (Graft versus Host Disease), ceci implique d'une part une **toxicité réduite** pour les patients mais également la possibilité d'utiliser des cellules allogéniques (contrairement aux CAR-T cells autologues) voire des lignées (principalement la lignée **NK-92**), facilitant et réduisant le coût de la production de ces cellules. Par ailleurs, les cellules tumorales n'expriment pas toutes un antigène tumoral, ni le même antigène tumoral et présentent ainsi une certaine hétérogénéité. Contrairement aux LT, les cellules NK sont dotées d'une cytotoxicité naturelle envers les cellules tumorales, grâce à l'expression de récepteurs tels que les KIRs. Ainsi, les CAR-NK ont l'avantage de pouvoir cibler à la fois l'antigène tumoral pour lequel elles ont été conçues mais également l'ensemble des molécules activatrices pouvant être exprimées par les cellules transformées. Cette caractéristique leur donne ainsi la possibilité d'éliminer également les cellules tumorales n'exprimant pas l'antigène ciblé se trouvant à proximité et limite également les possibilités d'échappement des cellules tumorales (Shah and Mailankody, 2020). Enfin, il semblerait que les cellules NK matures aient une durée de vie plus courte après injection, limitant ainsi le risque de

transformation ou GvHD. Toutefois, il semble nécessaire de démontrer que cette caractéristique ne limite pas leur efficacité anti-tumorale (Klingemann, 2014; Glienke et al., 2015).

Les CAR-NK peuvent également intégrer des séquences codant des cytokines telles que l'**IL-15** afin de potentialiser la survie de ces cellules *in vivo* (Tong et al., 2016; Liu et al., 2018). Par ailleurs, le développement des CAR-T exprimant la forme modifiée du récepteur à l'IL-2, appelée **Ortho-IL-2R**, pouvant interagir uniquement avec la forme modifiée **OrthoIL-2**, permet de limiter les effets toxiques induits par l'injection d'IL-2 et a montré des effets prometteurs dans des modèles pré-cliniques. Cette stratégie pourrait également être envisagée pour les cellules NK (Sokolosky et al., 2018).

Aujourd'hui, aucune cellule CAR-NK n'a encore reçu d'autorisation d'utilisation en clinique. Toutefois, de nombreux essais sont en cours avec des résultats préliminaires encourageants pour le traitement des tumeurs d'origine hématologique (Liu et al., 2020).

4.2.3. Vers des « super » cellules NK

Le succès thérapeutique du transfert adoptif de cellules NK fait aujourd'hui face à plusieurs enjeux de taille et la manipulation *in vitro* des cellules avant injection chez les patients permet d'optimiser leur nombre ainsi que leurs fonctions effectrices. Ainsi, une multitude de protocoles sont testés et évalués afin d'obtenir l'effet clinique le plus efficace et durable, et seront brièvement présentés dans cette partie. Il est important de garder à l'esprit que cette manipulation implique un respect de normes assurant une certification dite de grade clinique c'est-à-dire remplissant les critères de sécurité nécessaire pour une utilisation sans danger pour les patients. Ceci concerne l'intégralité du processus, depuis l'isolation des cellules à la ré-infusion, en passant par l'expansion *in vitro* (McKenna et al., 2007). Le choix de la source, de la méthode d'isolation ainsi que de la plateforme d'expansion des cellules NK est également un élément crucial mais qui ne sera pas détaillé car au-delà du champ de mon travail. Brièvement les cellules NK peuvent être issues du **sang périphérique** de donneurs sains ou de patients (Iyengar et al., 2003), de la différenciation de **cellules souches pluripotentes** de la moelle (Eguizabal et al., 2014) ou de **sang de cordon** (Spanholtz et al., 2010; Luevano et al., 2012a), voire de **lignées cellulaires** (Klingemann et al., 2016), et leur origine conditionne le rendement et l'efficacité de l'expansion *in vitro*, chaque source présentant des avantages et des inconvénients qui sont exposées dans l'article d'état de l'art de (Davis et al., 2015).

Ainsi, l'ensemble des signaux conduisant à l'activation des cellules NK peuvent être reproduits ou mimés *in vitro* afin d'augmenter le nombre de cellules ainsi que leurs propriétés anti-tumorales. Pour cela, de nombreuses stratégies reposant sur l'utilisation *in vitro* de cytokines recombinantes, d'anticorps agonistes des récepteurs activateurs mais également de lignées cellulaires déficientes pour l'expression des molécules du CMH-1, seules ou en combinaison, sont évaluées pour moduler la maturation, la prolifération, la survie et le phénotype des cellules NK avant transfert adoptif.

Ainsi, des cytokines telles que l'**IL-2** et l'**IL-15**, déjà utilisées en clinique, mais également l'**IL-12**, l'**IL-18** ou l'**IL-21** sont actuellement utilisées dans les protocoles d'expansion *in vitro* des cellules NK (Luevano et al., 2012b; Denman et al., 2012; Lim et al., 2013b; Colombo and Trinchieri, 2002; Shah et al., 2013; Choi et al., 2014; Alnabhan et al., 2015; Torelli et al., 2015; Granzin et al., 2016; Ayello et al., 2017). Leur action peut être complétée par d'autres molécules régulant la différenciation des cellules NK telles que **FL** ou **KL** (Wu et al., 2017). Ces conditions de culture permettent d'augmenter la viabilité, la prolifération, les fonctions effectrices mais également l'expression de récepteurs activateurs induisant une réponse accrue à d'autres signaux activateurs *in vitro* ou *in vivo* après infusion (Huenecke et al., 2010; Iliopoulou et al., 2010; van Ostaijen-ten Dam et al., 2016).

Dans ce sens, une autre stratégie est la co-culture avec d'autres cellules dites **nourricières** (« **feeder cells** ») qui permettent d'apporter des facteurs essentiels au développement des cellules NK. Par exemple, la co-culture avec des cellules primaires telles que des **PBMCs**, d'origine autologue ou allogénique, permet de potentialiser l'expansion et l'activation *in vitro* des cellules NK (Miller et al., 1992; Rabinowich et al., 1991; Rölle et al., 2014; Torelli et al., 2015). Par ailleurs, l'utilisation de **lignées de CPAg** ou **tumorales**, génétiquement modifiées ou non, a également montré un bénéfice thérapeutique dans la génération *in vitro* de cellules NK compétentes (Harada et al., 2004; Denman et al., 2012; Shah et al., 2013; Lim et al., 2013b, 2013a; Bae et al., 2012; Vasu et al., 2015; Ayello et al., 2017). Toutefois, ces stratégies nécessitent une irradiation préalable des cellules nourricières voire la purification des cellules NK après leur activation, afin d'éviter des complications critiques pour la survie du patient telles qu'une prolifération incontrôlée *in vivo* ou des effets dus à la présence de LT ou LB résiduels tels que l'effet GvHD, des désordres lymphoprolifératifs ou la lyse des globules rouges (Ho and Soiffer, 2001; Miller et al., 2005; Skeate et al., 2013; Ahn et al., 2013). En outre, cette irradiation des cellules co-cultivées avec les cellules NK peut augmenter l'expression de molécules de stress, ligands des récepteurs activateurs des cellules NK (Ahn et al., 2013).

A l'exception des cellules CAR-NK peut-être, un des enjeux de l'activation *in vitro* des cellules NK est d'induire une expansion significative sans qu'elle soit pour autant sélective, ce qui aurait pour effet de réduire la polyvalence, la diversité des cellules NK et donc diminuer la diversité des signaux qui pourraient les activer *in vivo*. En ce sens, ces stratégies ne sont pas exclusives et leur combinaison permet de cibler une plus grande diversité de cellules NK mais également d'obtenir des cellules avec un phénotype de grand intérêt, telles que les CIML (Cooper et al., 2009; Romee et al., 2012). L'évaluation et la comparaison de différents « cocktails » d'expansion et d'activation des cellules NK *in vitro* est aujourd'hui un champ de recherche très dynamique (Wang et al., 2000; Shah et al., 2013; Vasu et al., 2015; Torelli et al., 2015; Granzin et al., 2016; Romee et al., 2016; Ayello et al., 2017). Toutefois, la possibilité d'épuisement des cellules NK en réponse à des stimuli trop fréquents ou trop puissants peut limiter l'efficacité durable de ces traitements, et doit donc être prise en compte dans l'établissement des protocoles d'expansion *in vitro* (Felices et al., 2016).

En conclusion, l'ensemble des données présentées dans cette partie dédiée au ciblage thérapeutique des cellules NK souligne l'importance de la **combinaison** de ces différentes stratégies entre elles ou avec d'autres approches thérapeutiques, ciblant ou non le système immunitaire, afin de potentialiser l'effet anti-tumoral. En ce sens, plusieurs stratégies de combinaisons comprenant au moins une thérapie ciblant les cellules NK sont aujourd'hui utilisées en clinique et l'évaluation pré-clinique et clinique du bénéfice de nouvelles combinaisons est en cours (Moga et al., 2008; Roberti et al., 2011). Une meilleure connaissance de chacun des mécanismes indépendamment devrait ainsi permettre une utilisation « rationnelle » de ces stratégies thérapeutiques c'est-à-dire en identifiant les combinaisons les plus prometteuses pour le développement de nouveaux essais cliniques (Zhang et al., 2012b). Enfin, lorsque le transfert adoptif de cellules NK n'est pas envisageable, l'infiltration en cellules NK est un critère primordial pour le succès de ces thérapies et qui ne doit pas être négligé car souvent à l'origine de l'inefficacité de ces traitements (Putz et al., 2017; Zitvogel et al., 2016; Zemek et al., 2019).

Ce chapitre nous a permis d'apprécier les aspects propres à la biologie des cellules NK. Ainsi, entre autres activateurs, les cellules NK sont dépendantes d'un grand nombre de cytokines qui vont réguler leur différenciation et leur activité. Nous nous sommes donc intéressés à la régulation de l'activité des cellules NK en réponse aux cytokines et plus particulièrement en réponse à l'IL-33, et en comparaison avec d'autres cytokines appartenant à la famille des IL-1s telles que l'IL-18, l'IL-1 α ou encore l'IL-1 β . Les caractéristiques de l'IL-33 et de son activité biologique seront donc abordées dans le second chapitre.

Chapitre 2 : L'interleukine-33, facteur nucléaire et alarmine régulatrice des réponses immunitaires

Les **cytokines** sont les messagers solubles permettant aux cellules immunitaires mais également stromales de communiquer entre elles pour assurer la mise en place d'une réponse immunitaire adaptée, efficace et durable. Ces cytokines sont **nombreuses, pléiotropes et versatiles** : elles peuvent transmettre tant un signal activateur ou inhibiteur, agissent sur de nombreuses cellules cibles, et une même cytokine peut exercer des fonctions duelles selon le contexte dans lequel elle intervient. Elucider leur régulation et leurs modes d'action est un enjeu central dans la compréhension de nombreux processus physio-pathologiques. Dans ce vaste paysage, je me suis particulièrement intéressée à l'**Interleukine-33 (IL-33)**, dont les caractéristiques ainsi que les fonctions seront présentées dans ce chapitre.

Encadré 1 : Les cytokines de la famille des IL-1s

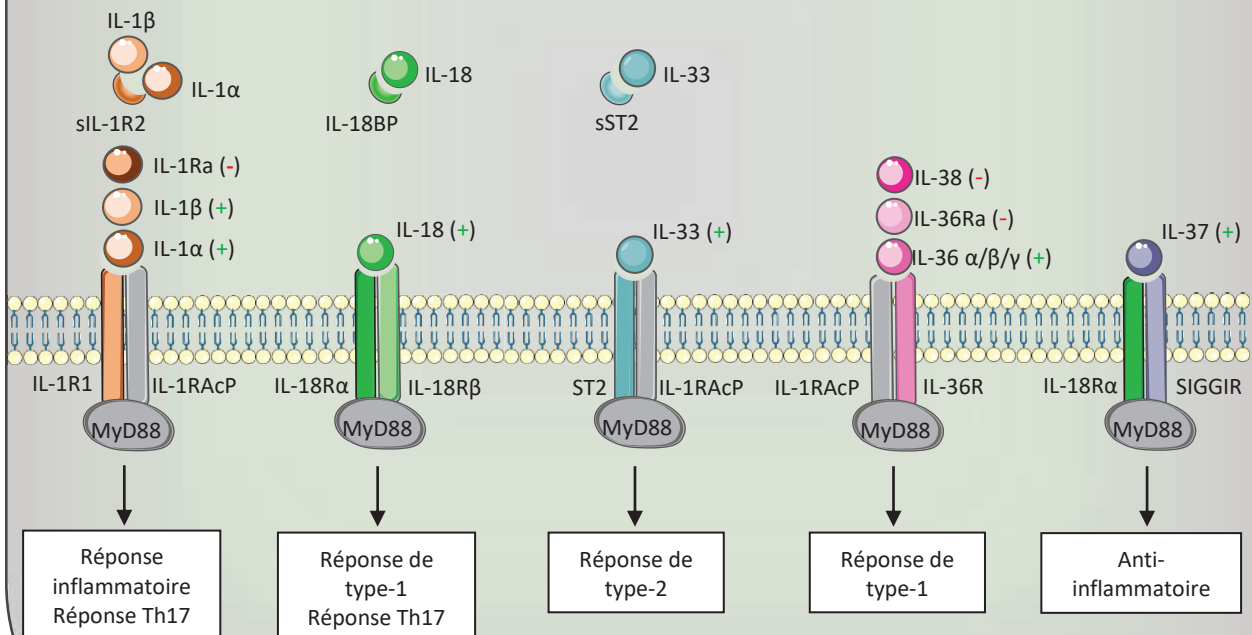
La famille des IL-1s est composée de :

- 8 cytokines **agonistes** : IL-1 α , IL-1 β , IL-18, IL-33, IL-36 α , IL-36 β , IL-36 γ , IL-37
- 6 cytokines et molécules **antagonistes** : IL-38, IL-1Ra, IL-36Ra, sST2, IL-18BP et sIL-1R2

Elles présentent une structure génique commune ainsi qu'une organisation protéique similaire caractérisée par la présence d'un ensemble de feuillets β dans leur domaine actif. Elles reconnaissent chacune un récepteur qui leur est spécifique. Les cytokines de la famille des IL-1s transmettent généralement un signal pro-inflammatoire via le recrutement de l'adaptateur **MyD88** et l'activation des voies **NF- κ B** et des **MAPK**.

A titre d'exception, l'IL-37 et l'IL-38 ont une activité anti-inflammatoire sur les voies des IL-1 α/β et de l'IL-36 respectivement.

Les molécules antagonistes IL-1Ra et IL-36Ra se lient aux récepteurs IL-1R1 et IL-36R respectivement, inhibant ainsi les voies de signalisation de l'IL-1 et de l'IL-36. Les molécules solubles sST2, IL-18BP et sIL-1R2 quant à elles se lient directement aux cytokines IL-33, IL-18 et IL-1 α/β empêchant ainsi leur fixation sur leurs récepteurs respectifs.



I. L'Interleukine-33, alarmine de la famille des IL-1s

Initialement identifiée comme facteur exprimé dans le noyau des cellules endothéliales constituant les vaisseaux permettant l'entrée des lymphocytes dans les OLS appelés « HEV » (High Endothelial Venules), l'IL-33 appartient à la vaste famille des **IL-1s** regroupant à ce jour 8 **cytokines agonistes** (**IL-1 α** , **IL-1 β** , **IL-18**, **IL-33**, **IL-36 α** , **IL-36 β** , **IL-36 γ** , **IL-37**) et 6 molécules **antagonistes** (**IL-38**, **IL-1Ra**, **IL-36Ra**, **sST2**, **IL-18BP** et **sIL-1R2**). Les cytokines de la famille des IL-1 transmettent généralement un signal pro-inflammatoire, à l'exception de l'IL-37 et l'IL-38 qui ont une activité anti-inflammatoire (Baekkevold et al., 2003; Schmitz et al., 2005; Garlanda et al., 2013). L'ensemble des membres de la famille des IL-1s ainsi que leurs récepteurs sont présentés dans l'**encadré 1**.

En tant que protéine, l'IL-33 exerce une activité duelle et est ainsi impliquée dans des contextes physio-pathologiques variés.

1. Du gène à la protéine

Le gène codant l'IL-33 est localisé sur le **chromosome 9** en position **9p24.1** chez l'Homme et sur le chromosome 19 en position 19qC1 chez la souris. Ces gènes codent une protéine de 270 et 266 acides aminés respectivement, présentant 55% d'homologie (Schmitz et al., 2005). La séquence génique compte 8 exons, une partie **N-terminale** codant une séquence de localisation nucléaire (Nuclear Localization Site, **NLS**) et un domaine de liaison à la chromatine (Chromatin Binding Domain, **CBD**) ; une partie **C-terminale** qui présente une forte homologie structurale avec les autres protéines de la famille des IL-1s (**domaine IL-1-like**) associée à la liaison avec son récepteur membranaire **ST2** et à sa fonction en tant que cytokine (Schmitz et al., 2005; Lingel et al., 2009; Luzina et al., 2019) (**figure 13**). La partie centrale présente plusieurs sites de **clivage** par des **protéases** tandis que le domaine IL-1-like contient un site de clivage pour les **caspases** (Lefrançais et al., 2012, 2014; Lüthi et al., 2009). Le clivage de l'IL-33 par ces différentes protéases assure un rôle régulateur qui sera plus largement abordé dans la suite de ce chapitre.

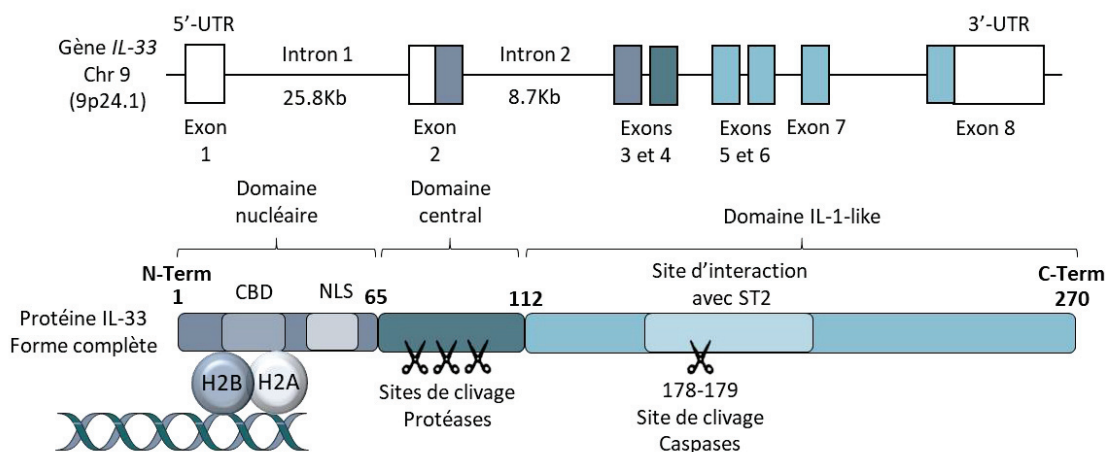


Figure 13. Expression de l'IL-33 dans la cellule : du gène au facteur nucléaire

Le gène de l'IL-33 se situe sur le chromosome 9 chez l'homme et est constitué de 8 exons. La protéine codée par ce gène est constituée de 3 domaines : un domaine nucléaire en position C-terminale et un domaine « IL-1-like » en position N-terminale, séparés par un domaine central. Le domaine nucléaire permet l'adressage de la cytokine au noyau, le domaine central joue quant à lui un rôle régulateur grâce à la présence de nombreux sites de clivages protéiques et le domaine « IL-1-like » permet l'interaction avec le récepteur ST2. Les rectangles blancs représentent des régions non codantes et les rectangles colorés représentent les exons. CBD: Chromatin Binding Domain, NLS: Nuclear Localization Site. Figure adaptée de (Liew et al., 2016).

Dans sa forme complète, la protéine IL-33 est donc systématiquement adressée et retenue dans le noyau dès sa synthèse (Carriere et al., 2007; Roussel et al., 2008). Les protéines impliquées dans le transport de l'IL-33 vers le noyau restent à identifier à ce jour (Clerman et al., 2017) (**Figure 14**).

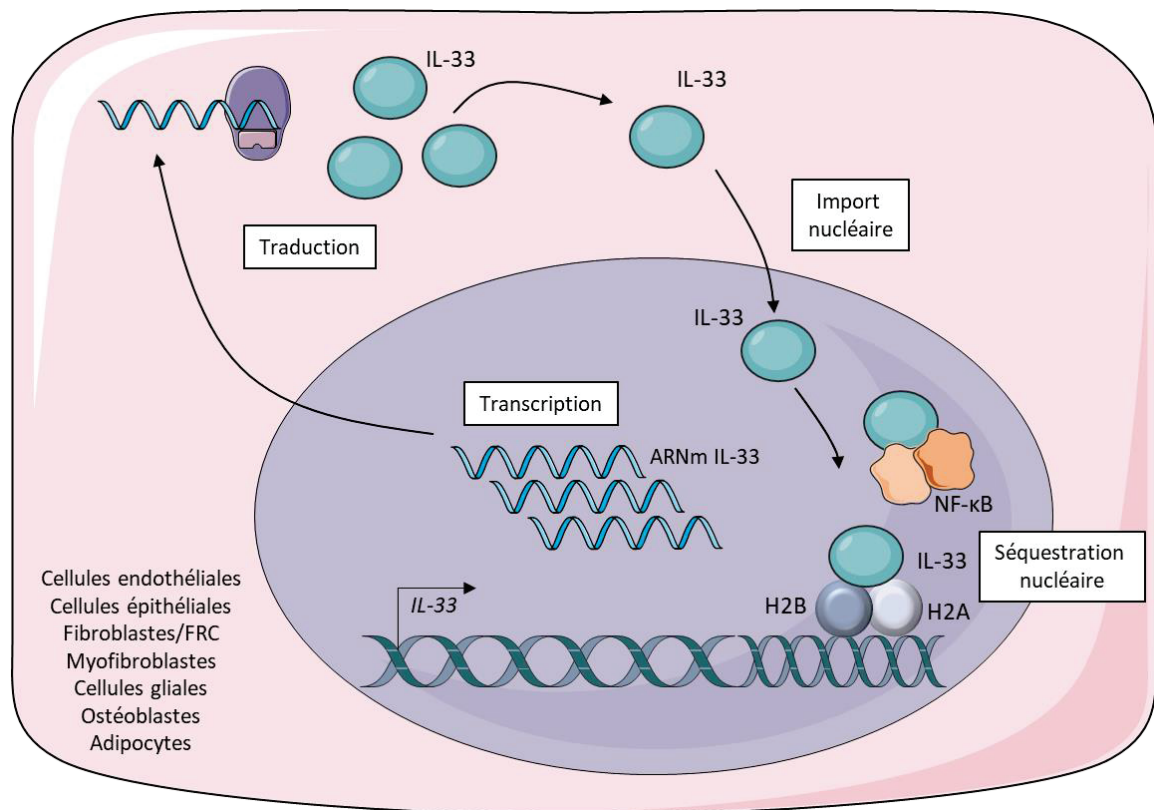


Figure 14. Localisation sub-cellulaire de l'IL-33

A l'état d'homéostasie, la protéine IL-33 est essentiellement exprimée dans des cellules non hématopoïétiques (cellules endothéliales, cellules épithéliales, fibroblastes, myofibroblastes, adipocytes, ostéoblastes). Dans ces cellules, l'IL-33 est constitutivement séquestrée dans le noyau où elle interagit directement avec les histones (H2A et H2B) grâce à son domaine nucléaire. L'IL-33 peut également interagir avec le facteur de transcription NF-κB et serait ainsi associée à un effet anti-inflammatoire.

2. Du facteur nucléaire à la cytokine

Comme l'IL-1α, l'IL-33 tient sa particularité dans sa localisation **nucléaire** à l'état d'homéostasie, essentiellement dans des **cellules non-hématopoïétiques**. Ainsi, l'IL-33 est constitutivement exprimée dans le noyau des **cellules endothéliales**, des fibroblastes de la zone réticulaire des OLS (**FRC**), de certaines **cellules épithéliales** (Schmitz et al., 2005; Mousson et al., 2008; Préfontaine et al., 2010; Pichery et al., 2012), des **cellules gliales** du cerveau ou de la rétine (Gadani et al., 2015; Xi et al., 2016), des **adipocytes** (Wood et al., 2009) et des **ostéoblastes** (Schulze et al., 2011). De manière intrigante, l'IL-33 n'est pas exprimée par les cellules endothéliales chez la souris (Pichery et al., 2012). L'IL-33 est exprimée dans de très nombreux tissus, avec un enrichissement au niveau des epithelia en contact avec l'extérieur (**poumons, peau, intestins, estomac**) (**Figure 15**).

L'expression nucléaire d'IL-33 augmente en réponse à des **stimuli inflammatoires** ou une **contrainte mécanique**, par exemple dans les cellules épithéliales du poumon en cas de pneumopathie obstructive chronique ou en réponse à l'exposition à de la fumée de cigarette, un allergène ou un pathogène (Byers et al., 2013; Kearley et al., 2015; Hardman et al., 2013; Le Goffic et al., 2011); dans les cellules épithéliales de l'intestin en conditions inflammatoires ou en cas de GvHD (Yasuda et al., 2012; Pascual-Reguant et al., 2017; Reichenbach et al., 2015); dans les kératinocytes en cas de dermatite atopique (Savinko et al., 2012) ou dans les cardiomyocytes après une contrainte mécanique induite *in vitro* ou suite à une anomalie vasculaire *in vivo* (Sanada et al., 2007). Les **fibroblastes**, **myofibroblastes** ou diverses **cellules stromales** peuvent également acquérir une forte expression d'IL-33 en réponse à une stimulation *in vitro* ou en conditions inflammatoires, et seraient impliqués dans la réparation tissulaire et le processus de fibrose (Manetti et al., 2010; Masamune et al., 2010; Sponheim et al., 2010; Marvie et al., 2010). Mécanistiquement, cette augmentation d'expression d'IL-33 a été observée en réponse à des **cytokines** pro-inflammatoires (**TNF- α** , **IFN- γ** , **IL-1 α** , **IL-1 β** , **IL-17**) (Meephansan et al., 2012a; Nomura et al., 2012; Demyanets et al., 2013; Mahmutovic Persson et al., 2018; Meephansan et al., 2013), des DAMPs (**HMGB1**, **ATP**) (Nile et al., 2010; Paris et al., 2014; Fu et al., 2016; Chang et al., 2017), des ligands des TLRs (**LPS**, **Poly I :C**, **flagelline**) (Ohno et al., 2009; Nile et al., 2010; Pichery et al., 2012; Zhang et al., 2011) ou à l'IL-33 elle-même (Hardman et al., 2013). De manière controversée, il a également été observé que l'expression d'IL-33 est induite dans les cellules hématopoïétiques telles que les **monocytes**, les **macrophages**, les **DCs**, les **pDCs** ou les **mastocytes** en réponse aux toxines bactériennes, au **LPS** ou à la **flagelline** *in vitro* ou en contextes inflammatoires *in vivo* (Ohno et al., 2009; Furukawa et al., 2017; Chen et al., 2017b; Hiraide et al., 2018; Weinberg et al., 2019; Yanagawa et al., 2011; Su et al., 2013; Hsu and Bryce, 2012). Le niveau d'expression rapporté dans les cellules hématopoïétiques reste bien inférieur à celui observé dans les cellules stromales, mais suffisant pour réguler divers phénomènes physio-pathologiques. De manière intéressante, l'analyse *in situ* par immuno-histochimie (IHC) ou immuno-fluorescence (IF) montre une expression plutôt cytoplasmique de l'IL-33 en présence d'un stimulus inflammatoire, parfois concomitante avec la détection de deux formes d'IL-33 par western blot, de 31kDa et 18-20kDa respectivement, pouvant être le signe d'une forme nucléaire ou cytoplasmique voire sécrétée respectivement (Sponheim et al., 2010; Nile et al., 2010; Beltrán et al., 2010; Hsu and Bryce, 2012; Duan et al., 2012; Fock et al., 2013; Paris et al., 2014; Furukawa et al., 2017; Chen et al., 2017b). Certaines de ces études sont fondées sur la détection de l'ARNm codant l'IL-33 par RT-qPCR (Nile et al., 2010; Yanagawa et al., 2011; Hsu and Bryce, 2012; Su et al., 2013; Chen et al., 2017b; Hiraide et al., 2018; Weinberg et al., 2019), toutefois les études basées sur la détection de la protéine IL-33 par immunofluorescence ou par western blot (Ohno et al., 2009; Furukawa et al., 2017) et utilisant des anticorps à l'origine d'un signal non spécifique (anticorps polyclonal de lapin, R&D : signal identique chez les souris WT et les souris //33-KO, données obtenues dans l'équipe du Dr. Jean Philippe Girard à l'IPBS, Toulouse ou anticorps monoclonal de souris, Nesy-1, Enzo : signal cytoplasmique conservé dans des fibroblastes traités avec un siARN spécifique de l'ARNm codant l'IL-33, données personnelles) sont questionnables quant à la véracité de l'expression cytoplasmique d'IL-33 dans les cellules hématopoïétiques.

En effet, en réponse à un stress cellulaire induit par les rayons ultraviolets (Meephansan et al., 2012b), la **pression mécanique** (Kakkar et al., 2012; Chen et al., 2015), la présence d'un **allergène** (Kouzaki et al., 2011; Haenuki et al., 2012) ou d'un **signal de danger** (Hudson et al., 2008), la **nécrose** (Lüthi et al., 2009; Rose et al., 2015) ou la **nécroptose** (Rickard et al., 2014; Shlomovitz et al., 2019), il a été observé que l'IL-33 nucléaire pouvait être libérée dans le milieu extracellulaire. Au niveau extracellulaire, l'IL-33 interagit avec son récepteur, un hétérodimère constitué des protéines **ST2 (IL-1RL1)** et **IL-1RAcP**, pour agir comme une alarmine en induisant une réponse immunitaire puissante (Schmitz et al., 2005). La chaîne IL-1RAcP est également le co-récepteur d'IL-1R1, récepteur des IL-1 α/β (Lingel et al., 2009).

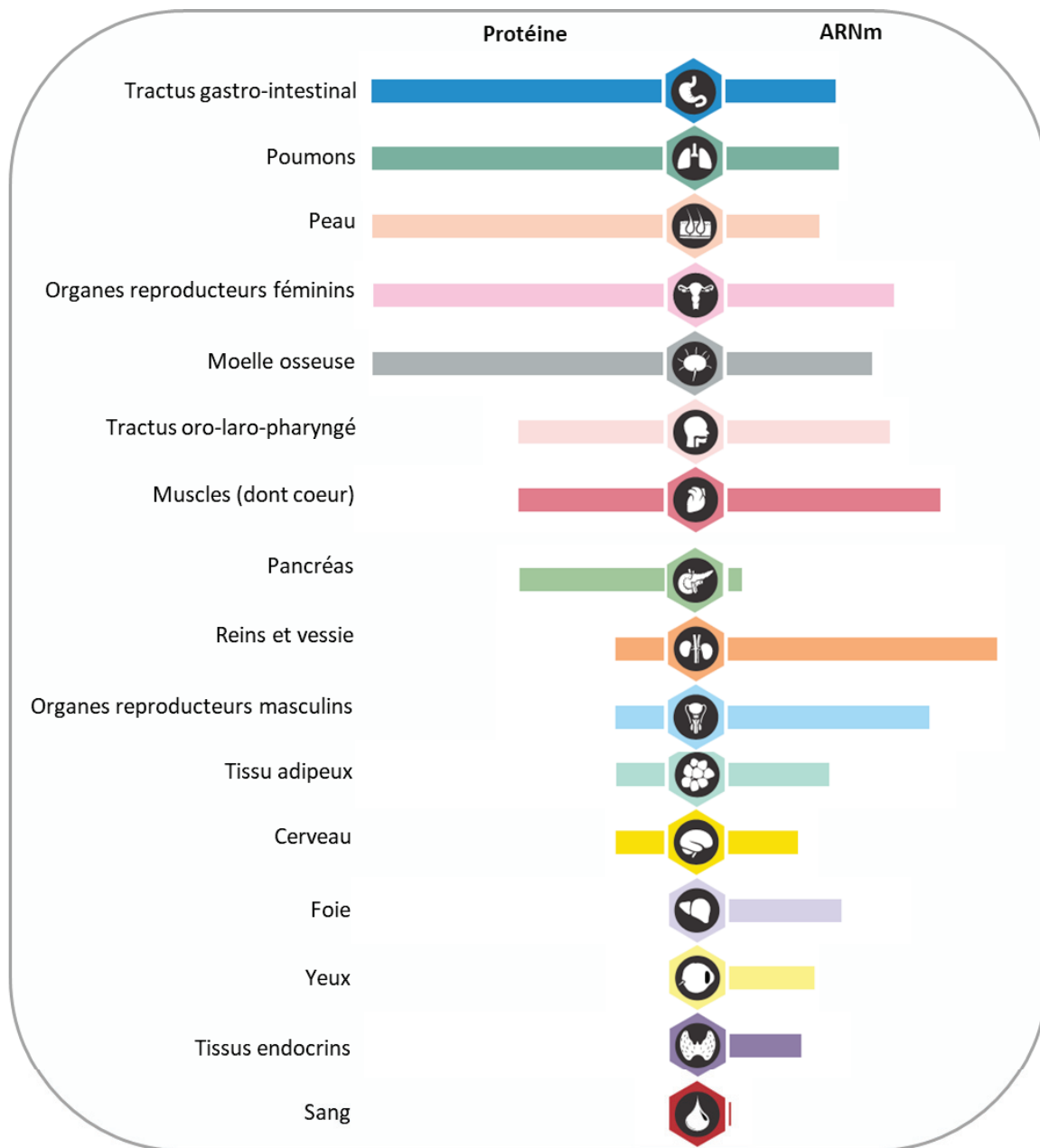


Figure 15. Expression de l'IL-33 (ARNm et protéine) dans les différents tissus chez l'homme

L'IL-33 est exprimée dans de très nombreux tissus et notamment dans les tissus épithéliaux au niveau des barrières avec l'environnement extérieur (poumons, intestins, peau, organes reproducteurs féminins). Dans ces tissus, elle remplit son rôle d'alarmine en réponse à la présence d'un signal de danger et de dommages tissulaires. Elle est également fortement exprimée dans la moelle, les muscles ou encore le pancréas. En accord avec son expression dans les cellules non hématopoïétiques, elle est très faiblement ou pas exprimée dans le sang à l'état d'homéostasie. Figure adaptée de The Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org/search/IL33>).

II. Mécanismes de libération de l'IL-33

L'IL-33 ne possédant pas de peptide signal dans sa séquence, il a très rapidement été suggéré que sa sécrétion soit indépendante de la voie classique du réticulum endoplasmique-appareil de Golgi et soit assurée par des mécanismes et voies **non-conventionnels**. Toutefois, en raison de nombreuses contraintes techniques, les voies de libération de l'IL-33 dans le milieu extracellulaire demeurent aujourd'hui partiellement résolues. En effet, l'IL-33 s'**oxyde** très rapidement dans le milieu extracellulaire, empêchant ainsi sa détection par de nombreux outils actuellement disponibles (Cohen et al., 2015). En outre, l'incapacité à valider la spécificité du marquage cytoplasmique de l'IL-33 par certains groupes, chez la souris, mais également à travers nos expériences chez l'Homme, rend difficile l'étude du trajet de l'IL-33 depuis le noyau vers l'extérieur (Pichery et al., 2012). Loin de constituer une preuve irréfutable, la perte du signal nucléaire a été associée dans de nombreuses études à l'augmentation du signal cytoplasmique ou de la concentration en IL-33 extracellulaire, suggérant ainsi un potentiel lien entre ces différentes localisations subcellulaires et la libération d'IL-33 (Hudson et al., 2008; Haenuki et al., 2012; Kakkar et al., 2012; Kearley et al., 2015). Les signaux et mécanismes impliqués dans la libération d'IL-33 sont présentés dans la **figure 16**.

Ainsi, il a été suggéré que la libération d'IL-33 dans le milieu extracellulaire se fait par **voie passive**, et est irrémédiablement associée à une **perte d'intégrité de la membrane plasmique** liée à la **mort cellulaire** (Cayrol and Girard, 2009; Lüthi et al., 2009; Kearley et al., 2015). D'autres études rapportent une libération d'IL-33 *in vitro* en réponse à des *stimuli* tels que le **LPS**, des **ARN doubles brins**, des **cytokines** pro-inflammatoires (**IL-1 β** , **TNF- α** , **IFN- γ**) ou des **allergènes**, sans conclure sur l'intégrité cellulaire dans ces conditions. Toutefois, un papier récent établit un lien direct entre la présence d'allergène et la nécrose rapide des cellules épithéliales pulmonaires, suggérant que la mort cellulaire a peut-être été sous-estimée dans certaines études précédentes (Scott et al., 2018). Plus récemment, il a été observé que l'IL-33 extracellulaire peut être libérée en association avec les **histones**, formant ainsi des complexes de haut poids moléculaire (Travers et al., 2018). Par opposition, d'autres études sont en faveur d'un mécanisme **actif** de sécrétion, sans perte d'intégrité de la cellule (Kouzaki et al., 2011; Kakkar et al., 2012; Byers et al., 2013; Xia et al., 2015; Gordon et al., 2016). De nombreuses études identifient l'**ATP** extracellulaire, les **récepteurs purinergiques** de type P2 (**P2Y** ou **P2X**), les récepteurs activés par les protéases (Proteases Activated Receptor, **PAR**) et l'augmentation de **calcium** dans la cellule comme des facteurs impliqués dans la libération d'IL-33 (Kouzaki et al., 2011; Zhang et al., 2011; Kakkar et al., 2012; Snelgrove et al., 2014). Enfin, très récemment il a été observé que l'**allergène** *Alternaria alternata*, via une **activité protéolytique endogène**, dégrade les cellules épithéliales et ainsi déclenche leur nécrose et la libération d'IL-33 (Cayrol et al., 2018).

In vivo, l'IL-33 soluble est retrouvée dans les extraits de lavages broncho-alvéolaires en présence d'allergènes ou lors d'infections virales (Kouzaki et al., 2011; Le Goffic et al., 2011), dans le liquide cérébro-spinal suite à un dommage du système nerveux central (Gadani et al., 2015) ou encore dans l'ascite péritonéal en présence d'allergènes (Phospholipase A2, **PLA2**) ou d'**alun** (Palm et al., 2013; Rose et al., 2015). Toutefois, excepté pour la PLA2 et l'alun qui sont connus pour induire la nécrose des cellules, l'origine de l'IL-33 (*i.e.* libération passive ou active) ou l'intégrité des cellules ne sont pas clairement définies dans ces études. Chez l'homme, l'IL-33 soluble est retrouvée dans le **sérum** de patients atteints d'asthme, de dermatite atopique, d'arthrite rhumatoïde (également détectée dans le liquide synovial dans ce cas), de psoriasis, de dégénérescence maculaire ou en contexte tumoral ; ce dernier point sera plus largement développé en fin de ce chapitre (Raeiszadeh Jahromi et al., 2014; Tamagawa-Mineoka et al., 2014; Matsuyama et al., 2010; Mitsui et al., 2016; Xi et al., 2016; Hu et al., 2017a).

En conclusion, bien que les signaux induisant la libération d'IL-33 semblent relativement bien identifiés, les mécanismes et les voies moléculaires impliquées restent encore largement non identifiés. La présence d'IL-33 dans des **exosomes** sécrétés par les cellules infectées a également été rapportée (Ansari et al., 2013). En accord avec cette possibilité, plusieurs groupes ainsi que des observations réalisées au cours de ma thèse font l'état d'une localisation cytoplasmique sous forme de vésicules ou de *foci* d'IL-33 (Kakkar et al., 2012). A l'inverse, d'autres articles suggèrent plutôt une libération de la protéine directement dans le milieu extracellulaire, indépendamment des exosomes (Shlomovitz et al., 2019). Enfin, contrairement à l'IL-1 β et l'IL-18, la libération d'IL-33 est indépendante des caspases 1 et 8 et donc indépendante de l'activation de l'inflammasome (Ohno et al., 2009).

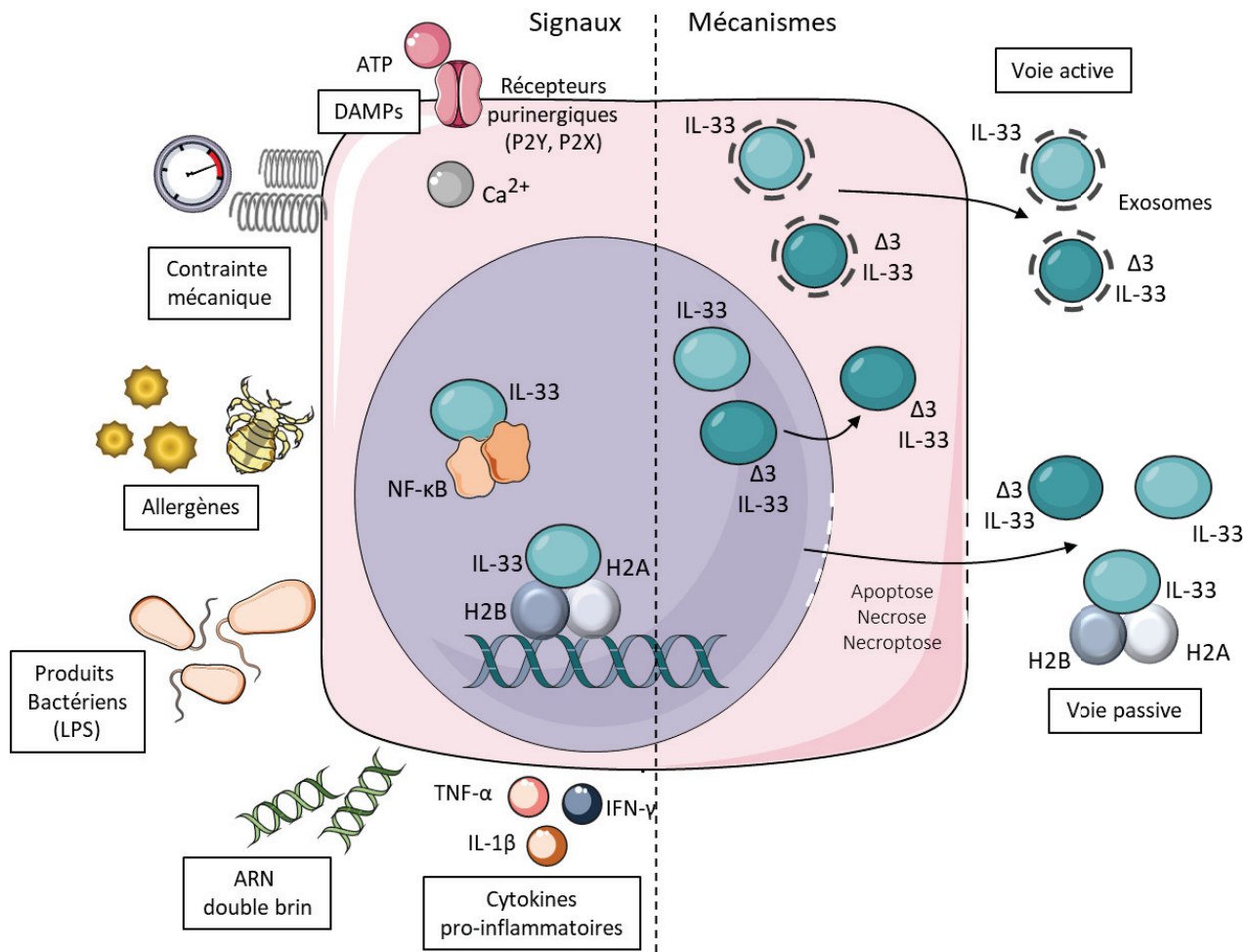


Figure 16. Signaux et mécanismes induisant la libération de l'IL-33 dans le milieu extracellulaire

L'IL-33 nucléaire peut être libérée dans le milieu extracellulaire en réponse à divers stress tels que la pression mécanique, la présence d'un allergène, de molécules associées à des pathogènes ou en réponse à des cytokines pro-inflammatoires. La libération d'IL-33 se fait par voie passive suite à la perte d'intégrité de la membrane plasmique en cas de dommages ou de mort cellulaires. Elle pourrait également se faire par voie active depuis le noyau vers le cytoplasme (épissage alternatif) ou depuis le cytoplasme vers le milieu extracellulaire (vésicules non conventionnelles telles que les exosomes). DAMPs : Danger-Associated Molecular Patterns. H2A/H2B : Histones H2A et H2B.

III. L'IL-33, une protéine finement régulée

En accord avec son rôle pro-inflammatoire puissant, l'IL-33 est régulée par de nombreux phénomènes transcriptionnels et post-traductionnels qui modulent son activité biologique.

1. Régulation par épissage alternatif

L'IL-33 peut subir un **épissage alternatif**, qui peut directement affecter sa fonction (Figure 17).

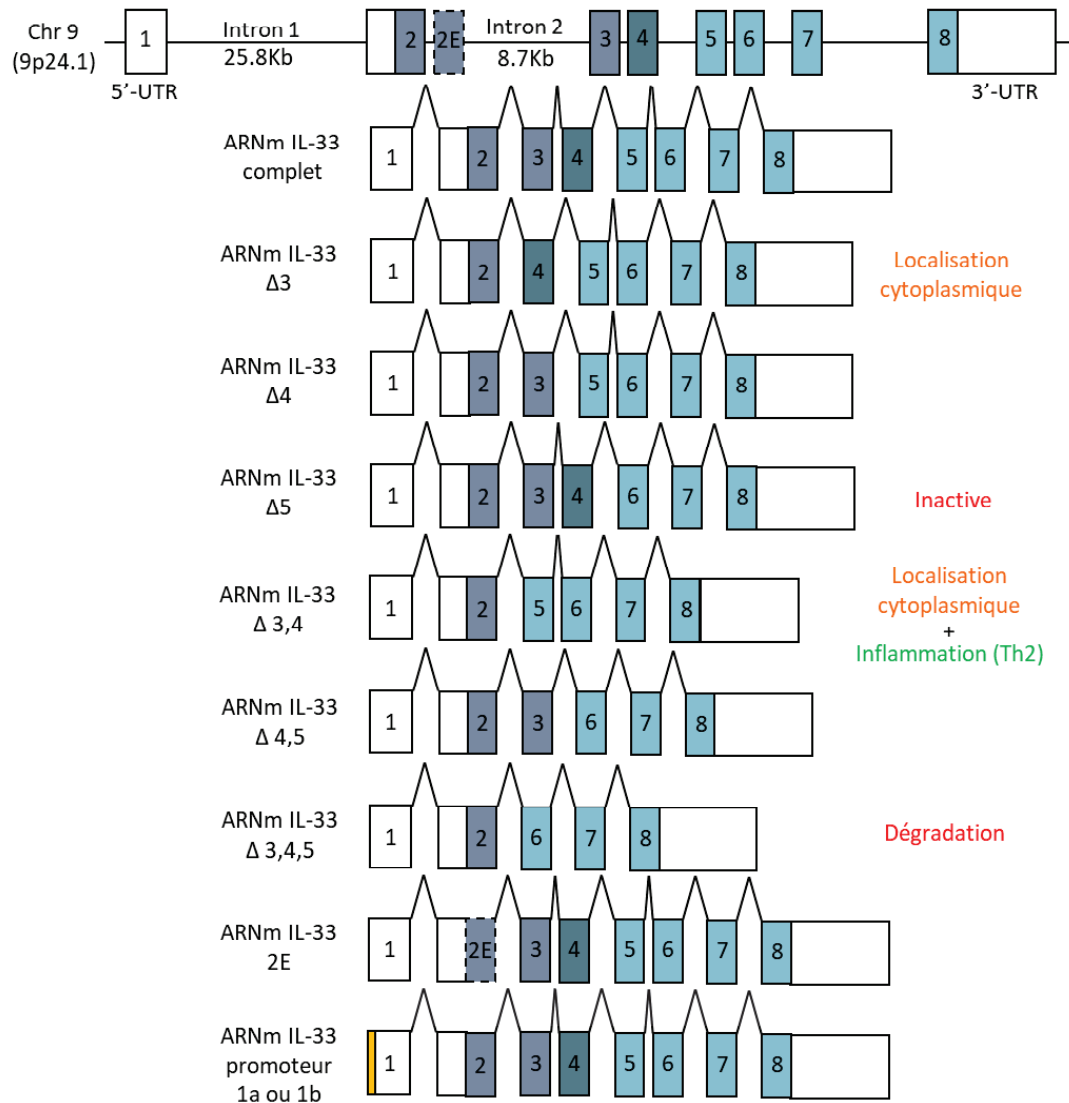


Figure 17. Epissage alternatif de l'IL-33

Composé de 8 exons et 2 introns, l'ARN messager de l'IL-33 peut subir un épissage alternatif au niveau des exons 3, 4 et 5 qui génère des formes tronquées de la protéine par épissage d'un ou plusieurs exons. Cet épissage régule l'activité de l'IL-33. Par exemple, l'épissage de l'exon 3 induit une perte de la localisation nucléaire, l'épissage de l'exon 5 induit une perte d'activité biologique et l'épissage simultané des exons 3,4 et 5 induit une dégradation de la protéine. Par ailleurs, il existe un variant de l'exon 3 appelé 2E ainsi que deux promoteurs alternatifs (1a ou 1b) qui peuvent être à l'origine de variants protéiques de la forme complète de l'IL-33. UTR : Untranslated Transcribed Region.

Des formes d'IL-33 tronquées pour un exon (**Δ3**, **Δ4** ou **Δ5**) ou plusieurs exons simultanément (**Δ3,4** ; **Δ4,5** ; **Δ3,4,5**) ont été observées, sans modification de la séquence protéique dans l'ensemble (à l'exception des variants **Δ3** ; **Δ3,4** et **Δ3,4,5** où le premier acide aminé suivant l'épissage est différent). Ces variants d'épissage sont exprimés dans diverses lignées et cellules primaires, dans des proportions variables (Tsuda et al., 2012; Gordon et al., 2016). Par ailleurs, l'épissage de l'exon 3 contenant la séquence **NLS** (**variant Δ3**) induit une délocalisation dans le **cytoplasme** après transfection et une activation constitutive de la voie induite par l'IL-33 en tant qu'alarmine (Carriere et al., 2007; Hong et al., 2011). Toutefois, dans une autre étude le variant **Δ3,4** plus fréquemment observé dans les poumons de patients asthmatiques est associé à une localisation **cytoplasmique** et à une forte **inflammation** de type-2 (IL-4, IL-5 et IL-13). Dans cette même étude, les variants **Δ5**, contenant le domaine IL-1, ne présentent aucune activité biologique et le variant **Δ3,4,5** co-localise avec les autophagosomes, suggérant une dégradation par **autophagie** de ce dernier (Gordon et al., 2016). D'autres variants ont été décrits, par exemple suite à la caractérisation de variants de l'exon 1 (*i.e.* **1a** et **1b**) correspondants à l'expression de promoteurs alternatifs (Talabot-Ayer et al., 2009) ou encore la description d'un nouvel exon présent dans l'intron 2 et nommé **2E** pour « Extra » (Tominaga et al., 2013). Toutefois, l'existence de ces variants chez l'homme ainsi que les protéines associées en contexte physiologique reste encore à démontrer.

2. Régulation à l'échelle de la protéine

Tout d'abord, l'IL-33 subit de nombreuses **modifications post-traductionnelles** qui contrôlent finement son activité biologique. Ces mécanismes ont probablement été sélectionnés au cours de l'évolution pour limiter une inflammation délétère, et sont résumés dans les **figures 18** et **19**.

Ainsi, la **séquestration** de l'IL-33 dans le noyau serait un mécanisme sélectionné au cours de l'évolution afin de limiter son activité en tant qu'alarmine, tout en assurant un stockage de la protéine sous forme mature en grande quantité pour induire une réponse rapide et puissante en cas de danger. En accord avec cette hypothèse, la suppression du domaine **NLS** de l'IL-33 induit une **sécrétion constitutive** et le décès des animaux par une inflammation généralisée de multiples organes vitaux. L'interaction de l'IL-33 avec les **histones** est extrêmement forte et stable, même après induction de la nécrose (Travers et al., 2018). De manière intéressante, certains pathogènes sont capables de mimer ce processus. Par exemple, la protéine **HpARI** du parasite *H. Polygyrus* interagit directement avec l'IL-33 d'une part et l'ADN d'autre part, limitant ainsi l'activité biologique de l'IL-33 par séquestration dans le noyau (Osborn et al., 2017).

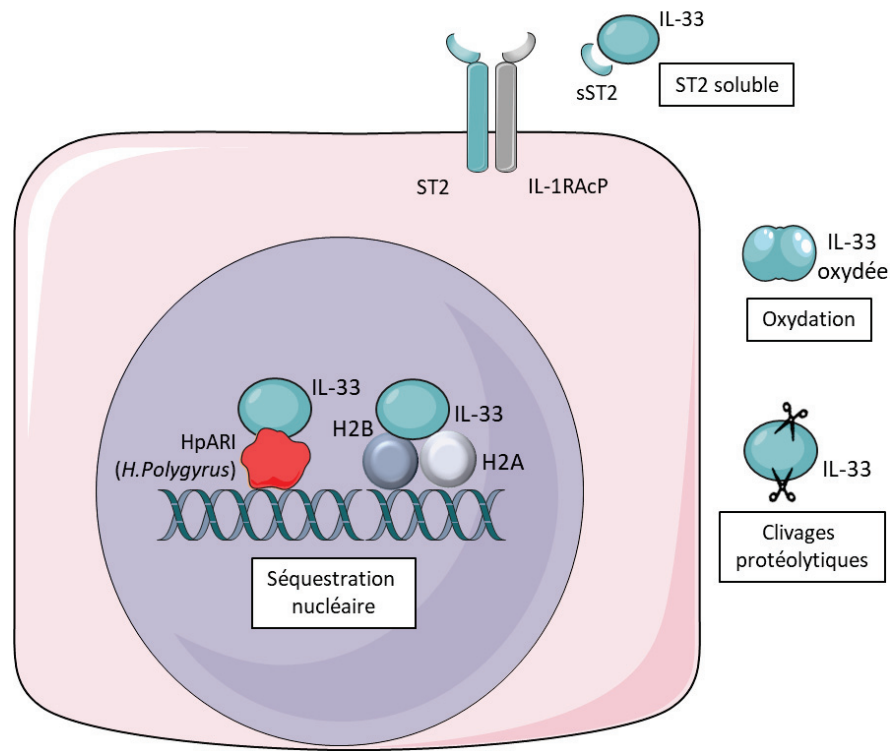


Figure 18. Mécanismes de régulation de la protéine IL-33

L'activité de l'IL-33 est également régulée à l'échelle de sa forme protéique dans le noyau, dans le cytoplasme et dans le milieu extracellulaire. Par exemple, la protéine HpARI du pathogène *H. polygyrus* interagit directement avec l'IL-33 et la chromatine pour permettre la séquestration de l'IL-33 dans le noyau et ainsi limiter la surveillance immunitaire. Ces mécanismes permettent également de limiter une activation trop importante ou prolongée de son activité d'alarmine via l'oxydation ou l'interaction de l'IL-33 extracellulaire avec le récepteur soluble sST2, mécanismes qui vont *in fine* empêcher la fixation de l'IL-33 sur le récepteur ST2 membranaire. Enfin, l'IL-33 est la cible de nombreux clivages par des protéases qui modifient son activité biologique. Ce mécanisme sera plus largement présenté dans la figure suivante.

Les clivages protéolytiques ciblant l'IL-33 sont nombreux (Figure 19). Ils n'ont pas lieu de manière systématique et concomitante, mais dépendent des protéases endogènes (issues des cellules épithéliales en nécrose ou des cellules immunitaires recrutées) ou exogènes présentes dans le microenvironnement selon le contexte inflammatoire (*i.e.* allergique ou infectieux) ou encore le niveau de dommages tissulaires. Contrairement à l'IL-1 β et à l'IL-18, l'IL-33 ne nécessite pas de clivage par l'**inflammasome** et est biologiquement active sous sa forme complète (Ohno et al., 2009; Cayrol and Girard, 2009; Talabot-Ayer et al., 2009). Toutefois, son activité biologique peut être modulée *in vitro* et *in vivo* par un ensemble de clivages protéolytiques. Ainsi, le clivage de l'IL-33 dans son domaine IL-1 par les caspases apoptotiques **Caspase-3** et **-7** empêche l'interaction avec ST2 et donc limite la propagation d'un signal de danger suite à la mort programmée de la cellule (Cayrol and Girard, 2009; Lüthi et al., 2009). Le clivage de l'IL-33 dans son domaine IL-1-like par la **caspase-1** inhibe également son activité (Cayrol and Girard, 2009; Madouri et al., 2015).

La présence dans son domaine central de nombreux motifs reconnus par les protéases rend l'IL-33 sensible au clivage par de nombreuses enzymes *in vitro* mais également *in vivo*. Par exemple, la **cathepsine G**, l'**élastase** et la **protéinase 3** produites par les neutrophiles activés clivent l'IL-33 dans son domaine central, produisant ainsi une forme tronquée d'activité biologique fortement accrue (Hayakawa et al., 2009; Scott et al., 2018; Lefrançais et al., 2012). Par ailleurs, les protéases issues des mastocytes activés telles la **chymase** ou la **tryptase** sont capables de cliver l'IL-33, pouvant ainsi potentialiser l'expansion des ILC2 et des éosinophiles en contexte allergique (Lefrançais et al., 2014).

Toutefois, une autre étude rapporte que le clivage d'IL-33 par la chymase diminuerait l'intensité de la réponse allergique (Roy et al., 2014). Ces résultats d'apparence contradictoire peuvent s'expliquer par l'importance de la structure tri-dimensionnelle des protéines pour réguler l'accessibilité de certains sites de clivage. En effet, l'IL-33 complète peut présenter des sites protéolytiques différents de l'IL-33 issue d'un premier clivage et tronquée. Ainsi, il est envisageable qu'une même protéase puisse cliver l'IL-33 à différents sites, avec des effets opposés sur son activité biologique. En accord avec cette hypothèse, il a été observé qu'une incubation courte de l'IL-33 avec la protéinase 3 clive l'IL-33 en deux fragments et potentialise son activité, tandis qu'une incubation longue génère une multitude de fragments dépourvus d'activité biologique (Bae et al., 2012). La **calpaïne**, protéase intracellulaire dont l'activité dépend du calcium, est également capable de cliver l'IL-33 en une forme biologiquement plus active. Cette protéase est libérée par nécrose des cellules épithéliales en présence d'un allergène, et ce de manière concomitante avec le calcium intracellulaire, précédemment identifié comme un des signaux induisant la libération d'IL-33 (Hayakawa et al., 2009; Scott et al., 2018). Enfin, en contexte allergique, l'allergène ***Alternaria alternata*** clive également directement l'IL-33 (30kDa) libérée par les cellules en nécrose, générant ainsi des formes de 18, 20, 22 à 23 kDa environ qui seraient jusqu'à 60 fois plus actives respectivement (Scott et al., 2018; Cayrol et al., 2018). Ce mécanisme est conservé au cours de l'évolution car observé en réponse à de nombreux **allergènes environnementaux** issus de moisissures, d'acariens, d'insectes, de plantes ou de bactéries (Cayrol et al., 2018). Ces études identifient donc le domaine central de l'IL-33 comme un capteur endogène de la présence d'allergènes, de dommages tissulaires et de pathogènes, pour induire une réponse immunitaire immédiate et nécessaire au retour à l'homéostasie. *In vivo*, des formes d'IL-33 tronquée de poids moléculaires similaires ont été identifiées dans le sérum de patients atteints de pathologies inflammatoires de l'intestin ou d'insuffisances cardiaques chroniques (Pastorelli et al., 2010; Zhang et al., 2012a).

Par ailleurs, comme évoqué précédemment, l'IL-33 s'**oxyde** très rapidement dans le milieu extracellulaire, induisant d'importants changements conformationnels tels que la formation de ponts disulfures qui empêchent son interaction avec ST2 (Cohen et al., 2015). Il a également été rapporté que l'IL-33 sérique serait biologiquement inactive bien que le mécanisme responsable de cette inactivation n'ait pas clairement été identifié (Dreis et al., 2019).

Enfin, le variant soluble de ST2 (**sST2**) fixe et **neutralise** l'IL-33 extracellulaire, régulant son activité et l'inflammation associée dans de nombreuses pathologies (Hayakawa et al., 2007; Sanada et al., 2007; Chen et al., 2015). Ce point sera plus largement abordé dans le paragraphe consacré au rôle physiopathologique de l'axe IL-33/ST2. De manière intéressante, l'IL-33 extracellulaire peut induire l'expression et la libération de sST2, régulant ainsi sa propre activité (Lécart et al., 2002; Bandara et al., 2015). Ainsi, il a été suggéré que le niveau de sST2 sérique puisse être utilisé comme un marqueur d'activation de la voie IL-33/ST2 (Shao et al., 2014; Bandara et al., 2015). Le co-récepteur **IL-1RAcP** peut également être sécrété sous forme soluble, augmentant ainsi la **stabilité** et l'activité de sST2 (Palmer et al., 2008).

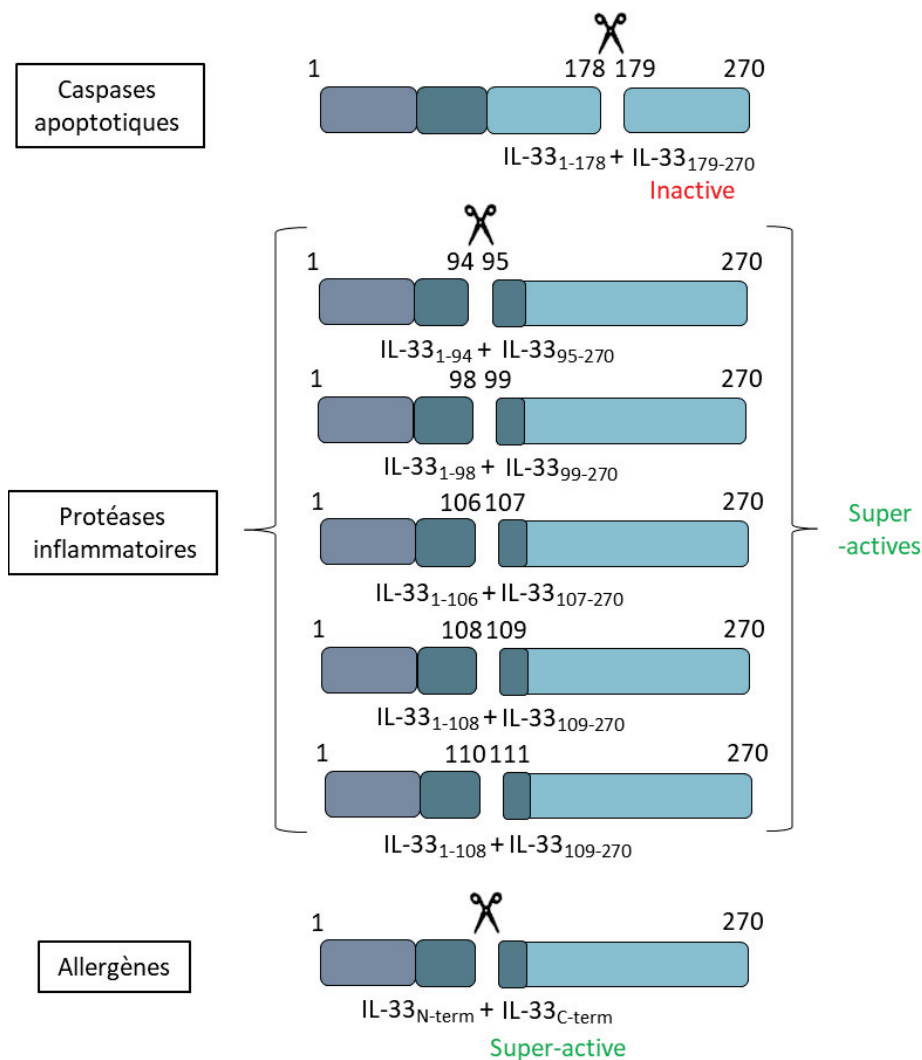


Figure 19. Régulation de l'activité d'alarmine de l'IL-33 par les protéases

L'IL-33 est active sous sa forme complète. Toutefois, elle contient dans sa séquence protéique de nombreux sites de clivages par diverses protéases qui régulent son activité. Ainsi, le domaine IL-1-like contient des sites de clivage par les caspases (1, 3 et 7) et le clivage par les caspases apoptotiques (3 et 7) induit une perte d'activité. Par ailleurs, le domaine central contient de nombreux sites de clivage par les protéases inflammatoires (cathépsine G, elastase, chymase, tryptase) sécrétées par les cellules immunitaires activées ce qui conduit à la potentialisation de son activité biologique. Enfin, les allergènes (issus d'acariens, de plantes, de bactéries ou encore d'insectes) peuvent directement cliver l'IL-33 grâce à leur activité endogène de protéase et ce mécanisme agit comme un système de détection de la présence d'allergène, induisant ainsi une puissante réponse immunitaire.

IV. Fonctions biologiques de l'axe IL-33/ST2

1. L'IL-33 en tant que facteur nucléaire

Séquestrée dans le noyau à l'état d'homéostasie, l'IL-33 interagit directement avec la chromatine, via l'interaction entre son domaine de liaison à la chromatine (CBD) et les hétérodimères d'histones **H2A/H2B** (Carriere et al., 2007; Roussel et al., 2008; Travers et al., 2018). Cette caractéristique la distingue de l'IL-1 α qui se lie directement à l'ADN plutôt qu'aux histones (Bertheloot and Latz, 2017). Il a été alternativement suggéré que l'IL-33 s'associe préférentiellement avec l'**hétérochromatine** ou à l'**euchromatine** (Kakkar et al., 2012; Carriere et al., 2007; Travers et al., 2018). Ainsi, il est difficile à ce jour de savoir si l'IL-33 se fixe de manière non spécifique à la

chromatine ou au contraire régule l'expression de gènes cibles précis. Bien que certaines études associent l'expression d'IL-33 nucléaire à une **répression** de la transcription, l'analyse transcriptomique de cellules épithéliales transfectées pour surexprimer l'IL-33 nucléaire ne montre pas de changement majeur dans le profil d'expression à l'état d'homéostasie (Travers et al., 2018). En accord avec cette observation, le profil protéomique de cellules endothéliales primaires n'est pas modifié suite à la perte d'expression d'IL-33 nucléaire par l'utilisation d'ARN interférants (siRNA) (Gautier et al., 2016). Toutefois, il n'est pas exclu que l'IL-33 ait un impact sur la transcription de certains gènes cibles en conditions inflammatoires. En effet, l'IL-33 nucléaire interagit directement avec le facteur de transcription pro-inflammatoire **NF-κB**, empêchant ainsi l'activation des gènes cibles de l'inflammation tels que **IkBa**, **Tnf-α** ou **c-Rel** (Ali et al., 2011). Par ailleurs, une étude a démontré par précipitation de la chromatine (ChIP) que l'IL-33 nucléaire se fixe directement sur le promoteur du gène codant l'**IL-6** bloquant ainsi sa production et sur le promoteur du gène **ST2** inhibant ainsi l'expression du variant **sST2** (Shao et al., 2014). A l'inverse, l'IL-33 serait capable de se fixer sur le promoteur du gène codant l'**IL-13** pour induire sa transcription (Ni et al., 2015). Enfin, l'IL-33 participerait également à la fixation du facteur de transcription **GATA3** dans le promoteur du gène **Foxp3**, maintenant ainsi son expression dans les Tregs de l'intestin (Schiering et al., 2014). Le rôle nucléaire de l'IL-33 est donc complexe et sujet à des résultats parfois contradictoires.

2. L'IL-33, une alarmine pléiotrope

Historiquement, l'IL-33 a été identifiée comme un puissant régulateur des cellules immunitaires impliquées dans la réponse de **type-2** qui expriment le récepteur ST2 de manière **constitutive**. Toutefois, bien plus tardivement, un ensemble d'étude ont permis de démontrer que, dans certains contextes pathologiques, l'IL-33 régule également l'activité de cellules immunitaires de **type-1**, notamment sous l'influence d'un environnement cytokinique spécifique. Les fonctions de l'IL-33 en tant qu'**alarmine** extracellulaire sont présentées dans cette partie.

2.1 Expression du récepteur ST2

Le gène codant ST2, **IL1RL1**, est localisé sur le **chromosome 2** en position **2q12.1** chez l'Homme et sur le chromosome 1 en position 19.19cM chez la souris (Tominaga, 1989; Dale and Nicklin, 1999). La protéine ST2 existe sous 3 isoformes chez l'Homme : une forme entière membranaire (**ST2L**), une forme soluble **sST2** transcrite à partir d'un promoteur alternatif et une forme tronquée membranaire (**ST2V**) issue d'un épissage alternatif dans la région C-terminale partiellement définis à ce jour (Li et al., 2000; Hayakawa et al., 2007; Tago et al., 2001) (**Figure 20**).

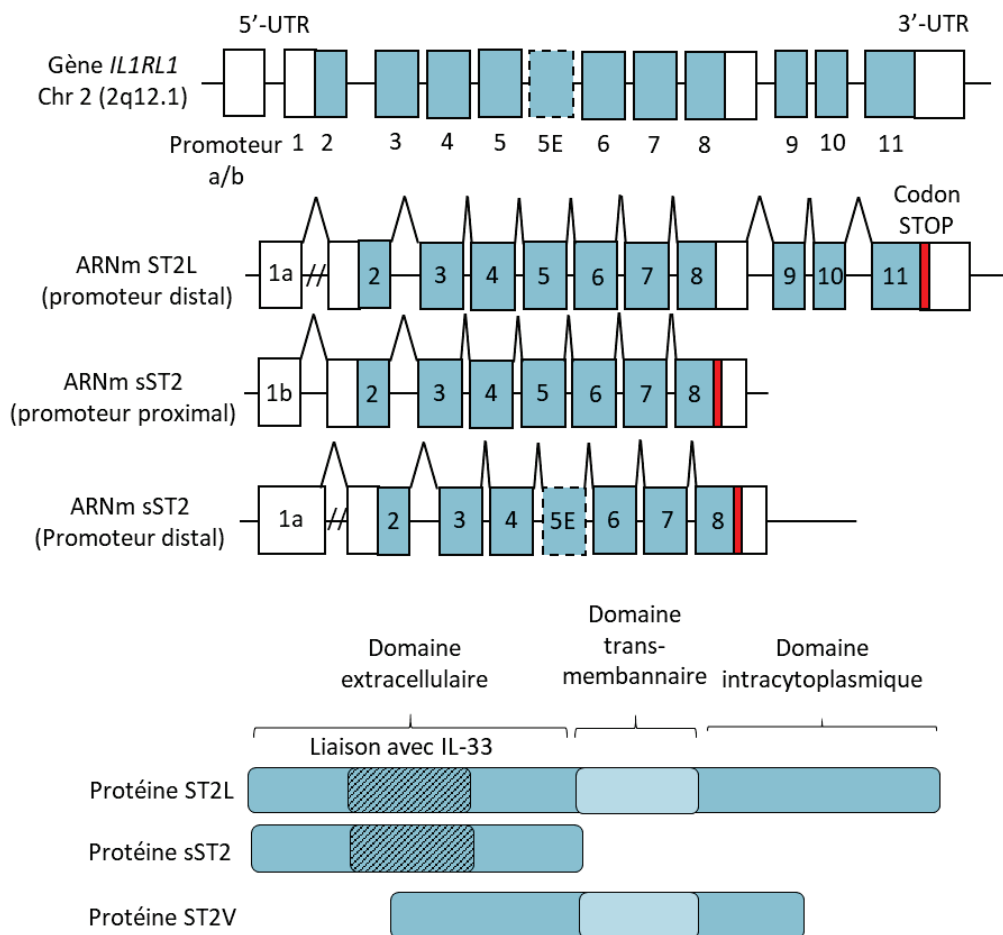


Figure 20. Le récepteur ST2/IL1RL1 : du gène aux différentes formes protéiques

Le gène du récepteur ST2/IL1RL1 se trouve sur le chromosome 2 chez l'homme et est constitué de 11 exons. Son expression est sous le contrôle de deux promoteurs : un promoteur distal (1a), qui est à l'origine de la forme transmembranaire longue (ST2L) du récepteur et un promoteur proximal (1b) qui est à l'origine de la forme tronquée soluble (sST2). Il existe également un variant appelé ST2V issu du promoteur distal et d'un épissage alternatif au niveau de la région C-terminale qui forme une protéine transmembranaire tronquée qui n'induit pas de signalisation.

Le récepteur **ST2** est fortement exprimé de manière **constitutive** par un ensemble de cellules immunitaires, avec des niveaux élevés détectés dans les **mastocytes** (Moritz et al., 1998), les **basophiles** (Suzukawa et al., 2008a; Pecaric-Petkovic et al., 2009), les **éosinophiles** (Cherry et al., 2008; Suzukawa et al., 2008b; Stolarski et al., 2010), les **neutrophiles** (Alves-Filho et al., 2010), les **ILC2** (Neill et al., 2010), les **LTh2** (Yanagisawa et al., 1997; Löhning et al., 1998), et des niveaux plus faibles ou hétérogènes dans les **DCs** (Rank et al., 2009), les **NKT** (Bourgeois et al., 2009), certains **Tregs** infiltrant les tissus (Schiering et al., 2014; Vasanthakumar et al., 2015), les cellules de la **microglie** (Cao et al., 2018) et les **lymphocytes innés B1** (Komai-Koma et al., 2011). ST2 a longtemps été utilisé comme marqueur spécifique des LTh2, et est aujourd'hui utilisé pour distinguer les ILC2 des autres lymphocytes innés (Xu et al., 1998; Spits et al., 2013). Cette expression constitutive peut être augmentée en réponse à divers stimuli tels que l'**IL-4** et l'**IL-5** via **STAT-5** et **GATA3** pour les LTh2 (Kumar et al., 1997); l'**IL-2** ou la **rapamycine** pour les DCs (Smithgall et al., 2008; Turnquist et al., 2008, 2010); l'**IL-12** via **T-bet** pour les NKT (Smithgall et al., 2008); l'**IL-2** ou l'**IFN-γ** pour les Tregs (Matta and Turnquist, 2016; Li et al., 2019a). Enfin, l'IL-33 peut elle-même potentialiser l'expression de son propre récepteur à la surface des basophiles et des lymphocytes B1 (Suzukawa et al., 2008b; Komai-Koma et al., 2011).

L'expression de ST2 peut également être **induite** à la surface d'autres cellules immunitaires, en réponse à divers signaux de danger ou pro-inflammatoires. En effet, elle peut être induite à la surface des **macrophages** activés par le **LPS**, l'**IL-1 β** , l'**IL-6** ou le **TNF- α** (Oshikawa et al., 2002; Brint et al., 2004; Ohno et al., 2011), à la surface des **LT CD8⁺** cultivés *in vitro* en conditions de différenciation de type **Tc1** (combinaison d'IL-2, d'IL-12 et d'anti-IL-4) ou **Tc17** (combinaison d'IL-23, d'IL-6, de TGF- β , d'anti-IFN- γ et d'anti-IL-4) ou en conditions de privation de nutriments (Yang et al., 2011; Dreis et al., 2019). L'expression de ST2 peut également être acquise à la surface des **LTc1** (Yang et al., 2011) et des **LTh1** (Smithgall et al., 2008; Blom and Poulsen, 2012) polarisés *in vitro*, des **LTc1** (Bonilla et al., 2012) et des **LTh1** (Baumann et al., 2015) *in vivo* en contextes viraux ou des cellules **NK** en réponse à une activation *in vitro* par l'**IL-12** (Smithgall et al., 2008; Bourgeois et al., 2009) ou par le **TNF- α** (Qi et al., 2020). De manière générale, l'expression induite de ST2 sur les LT de type-1 et les cellules NK est plus faible que sur les cellules de type-2, transitoire et semble en partie dépendante de l'activation des facteurs de transcription **T-bet** et **STAT-4** (Yang et al., 2011; Baumann et al., 2015). Une sous-population de **LTh17** peut également acquérir l'expression de ST2 en contexte inflammatoire (Pascual-Reguant et al., 2017).

En outre, l'expression de ST2 a été rapportée sur certaines cellules non hématopoïétiques telles que les **fibroblastes** en réponse à des facteurs de croissance, les **cellules endothéliales** en prolifération, certaines **cellules épithéliales**, les **cellules gliales**, les **ostéoblastes** ou encore les **cardiomyocytes** (Tominaga, 1989; Werenskiold et al., 1989; Oshikawa et al., 2002; Aoki et al., 2010; Pastorelli et al., 2010; Cao et al., 2018; Schulze et al., 2011; Weinberg et al., 2002). De manière intéressante, l'expression de ST2 sur les cardiomyocytes peut être induite par une pression mécanique mimant leur contraction (Weinberg et al., 2002).

2.2 Voies de signalisation en aval de ST2

Identifiée comme tel en 2005, l'IL-33 est à ce jour le ligand unique de ST2 (Schmitz et al., 2005). L'interaction d'IL-33 avec ST2 permet l'activation des nombreuses voies de signalisation présentées dans ce paragraphe et dans la **figure 21**.

Suite à son interaction avec l'IL-33, **ST2** se dimérise avec **IL-1RAcP** pour induire le recrutement de la protéine adaptatrice **MyD88**, qui elle-même recrute les kinases **IRAK1/IRAK4/TRAF6** pour activer les voies de signalisation **NF-KB (p65/p50)**, **p38** et **JNK (MAPK)** d'une part et recrute également les kinases **MEK1/2** pour activer **ERK1/2 (MAPK)** d'autre part (Palmer and Gabay, 2011). L'IL-33 induit également l'activation de la voie des **PI3kinases (PI3K)** qui induit l'activation de la voie **mTOR (S6)** (Salmond et al., 2012). Le corécepteur **IL-1RAcP** est absolument essentiel à l'activation de ces voies de signalisation (Palmer et al., 2008; Schmitz et al., 2005; Choi et al., 2012; Salmond et al., 2012). La surexpression de ST2 *in vitro* bloque l'activation de MyD88 en aval d'autres récepteurs comme IL-1R1 ou des TLR (TLR2, 4 et 9), diminuant ainsi l'inflammation induite en réponse aux ligands activateurs de ces voies (Brint et al., 2004). Toutefois, *in vivo* l'activation de l'axe IL-33/ST2 potentialise la réponse des macrophages après activation par le LPS (Espinassous et al., 2009; Ohno et al., 2011). Enfin, l'induction de ST2 sur les cardiomyocytes suite à une contrainte mécanique intense limite également leur hypertrophie via une inhibition compétitive au niveau de la voie NF- κ B (Sanada et al., 2007).

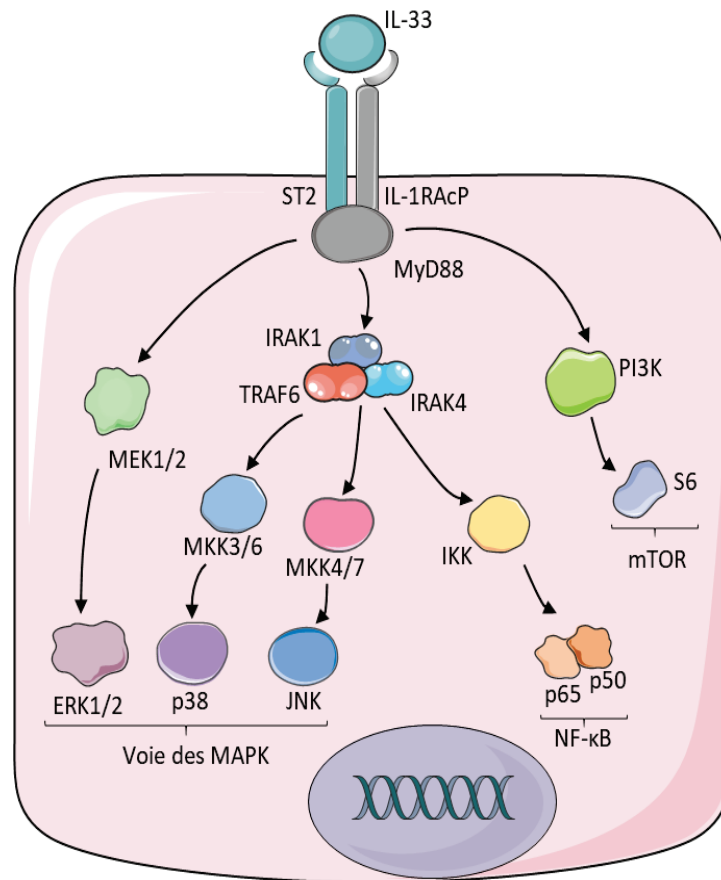


Figure 21. Voies de signalisation induites par l'axe IL-33/ST2

L'interaction de l'IL-33 avec ST2 permet le recrutement de la chaîne accessoire IL-1RAcP qui est nécessaire à la transduction du signal via le recrutement de l'adaptateur MyD88 responsable de l'activation des voies de signalisation MAPK (ERK, p38 et JNK), NF-κB et mTOR en aval.

De nombreuses cellules expriment le récepteur ST2, de manière constitutive ou inducible, et sont présentes dans les tissus exprimant fortement l'IL-33. L'axe IL-33/ST2 régule ainsi de nombreuses fonctions biologiques d'une grande diversité de cellules immunitaires essentiellement. Ces fonctions régulatrices sont représentées dans la **figure 22**.

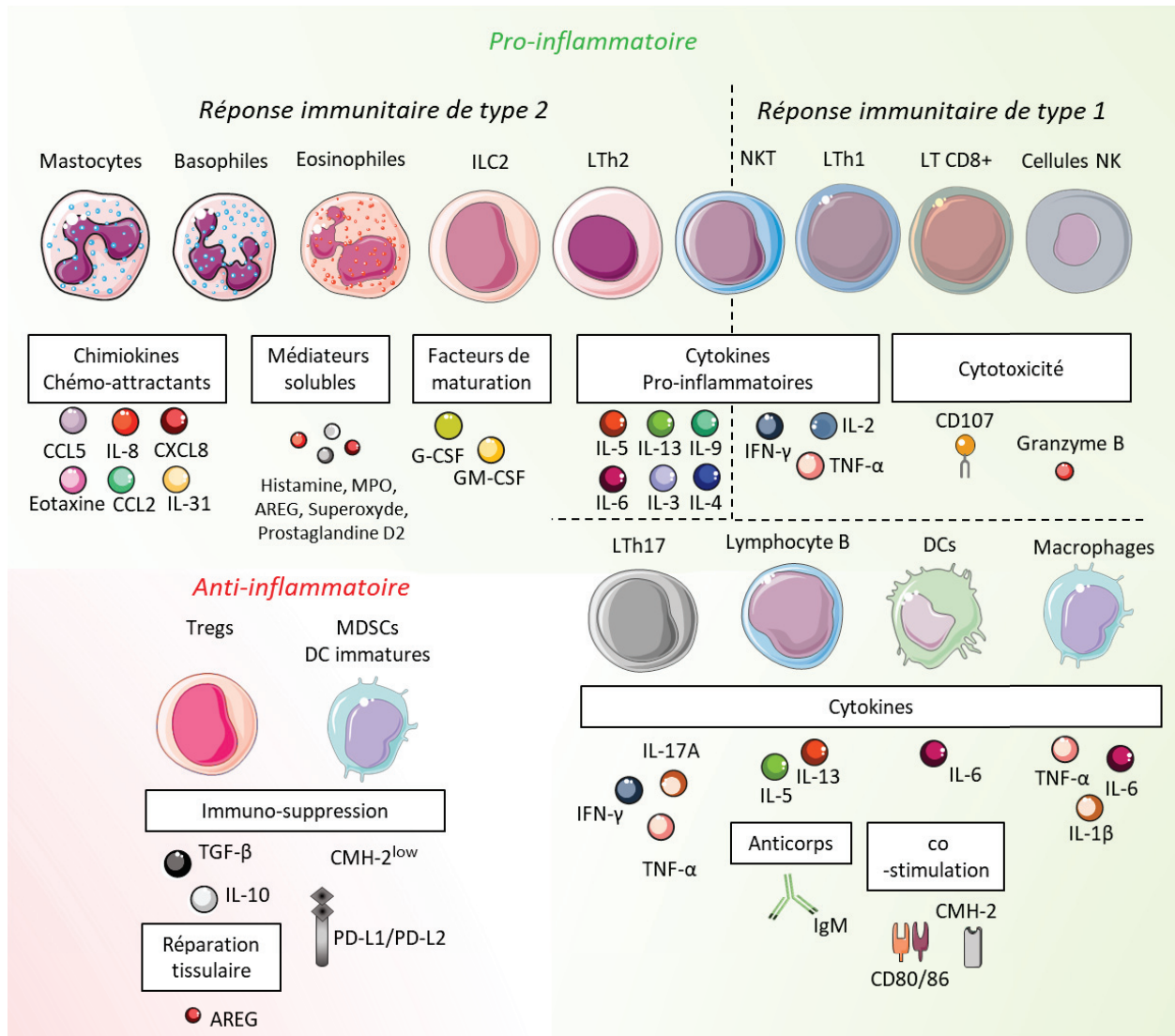


Figure 22. L'IL-33, une alarmine pléiotrope régulant la fonction des cellules immunitaires

En tant que cytokine, l'IL-33 est extrêmement pléiotrope et peut activer une multitude de cellules immunitaires, tant innées que adaptatives, de type-1 ou de type-2 et qui peuvent transmettre des signaux pro- ou anti-inflammatoires. L'issue de la réponse immunitaire induite par l'IL-33 dépend donc largement du contexte cellulaire et cytokinique dans laquelle elle évolue. Toutefois, les cellules qui expriment le récepteur ST2 de manière constitutive (cellules de type-2, Tregs, NKT) n'ont pas nécessairement besoin de la présence d'un autre signal pour répondre à l'IL-33. En revanche, pour les autres cellules, la présence de co-sinaux semble nécessaire pour induire l'expression de ST2 et donc la sensibilité à l'IL-33. Certains de ces co-sinaux tels que l'IL-12, le TNF- α ou encore l'IFN- α ont été identifiés. MPO : Myéloperoxydase, AREG : Amphiregulin, TSLP : Thymic Stromal Lymphopoietin

2.3 Activation des cellules immunitaires de type-2

Les cellules immunitaires de type-2 expriment ST2 de manière constitutive et sont donc sensibles à la présence d'IL-33 dans le milieu extracellulaire.

En tant que cellules innées résidentes des tissus et chargées de nombreux médiateurs solubles pro-inflammatoires, les **mastocytes** constituent l'une des premières lignes de défense en présence d'un signal de danger. Ainsi, l'activation des mastocytes par l'IL-33 induit la production de cytokines telles que l'IL-5, l'IL-6, l'IL-13, le TNF- α , le GM-CSF ou l'IL-3 ; mais également de chimiokines telles que

l'**IL-8**, **CCL5** ou **CCL2** (Ho et al., 2007; Allakhverdi et al., 2007; Iikura et al., 2007; Silver et al., 2010; Enoksson et al., 2011; Andrade et al., 2011; Sabatino et al., 2012). De manière intéressante, cette activation par l'**IL-33** est indépendante de la reconnaissance des IgE par les récepteurs FcεRI, et intervient ainsi dès la phase précoce de ces réponses immunitaires. En accord avec cette observation, l'**IL-33** seule n'induit pas la dégranulation des mastocytes (Ho et al., 2007; Moulin et al., 2007; Andrade et al., 2011; Iikura et al., 2007). Certaines études rapportent qu'elle synergise avec la voie **FcεRI/IgE** pour augmenter la libération de granules et de médiateurs solubles tels que l'**histamine** ou la **prostaglandine D2** ; tandis que d'autres groupes rapportent une absence de synergie entre ces deux voies (Moulin et al., 2007; Silver et al., 2010; Joulia et al., 2017; Iikura et al., 2007; Allakhverdi et al., 2007; Ho et al., 2007; Andrade et al., 2011). L'**IL-33** favorise également la différenciation des progéniteurs des mastocytes (Hepworth et al., 2012) ainsi que la survie, la prolifération ainsi que l'adhérence des mastocytes matures (Allakhverdi et al., 2007; Iikura et al., 2007; Wang et al., 2014a; Saluja et al., 2014). Enfin, en augmentant la production de protéases par les mastocytes (**tryptase**, **chymase**), l'**IL-33** peut indirectement réguler sa propre activité biologique en favorisant les clivages protéolytiques dans son domaine central (Maywald et al., 2015). Enfin, contrairement aux mécanismes présentés ci-dessus, il a été suggéré que la stimulation prolongée *in vitro* avec de fortes concentrations d'**IL-33**, pouvant mimer une exposition chronique à un allergène, induit une **hyporéactivité** des mastocytes, et pourrait constituer l'un des mécanismes moléculaires impliqués dans la désensibilisation (Jung et al., 2013).

Les **basophiles** sont également indirectement et directement impactés par la présence d'**IL-33**. Ainsi ils sont rapidement recrutés et activés par les médiateurs solubles produits au site de l'inflammation et précédemment décrits. Par ailleurs, l'**IL-33** augmente directement leur expression de **CD11b** et leur production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'**IL-4**, **IL-13**, **IL-5**, **IL-6** et **IL-9** (Suzukawa et al., 2008b; Kondo et al., 2008). En réponse à l'**IL-33**, les basophiles produisent plus d'**IL-4** et d'**IL-13** que les mastocytes (Kondo et al., 2008). Comme pour les mastocytes, l'**IL-33** seule n'induit pas leur dégranulation mais potentialise la réponse médiée par l'axe FcεRI/IgE (Suzukawa 2008, Silver 2010, Fux 2014). Elle agit également en synergie avec l'**IL-3** pour activer les basophiles, en partie via l'augmentation de **ST2** à leur surface (Suzukawa et al., 2008b; Pecaric-Petkovic et al., 2009; Blom et al., 2011). En outre, les basophiles activés peuvent agir comme cellules présentatrices d'antigène pour activer la différenciation des LTh2, et ce de manière accrue en présence d'**IL-33** (Yoshimoto et al., 2009).

L'**IL-33** agit également sur les **éosinophiles**, permettant ainsi leur recrutement, leur maturation, leur survie et leur prolifération. Elle permet également leur activation et leur adhérence au niveau du site d'inflammation. Aux stades précoces de l'inflammation, l'**IL-33** régule indirectement les éosinophiles à travers la production d'**IL-5** par les LTh2 et d'**IL-3**, d'**IL-5**, de **GM-CSF**, de **TNF-α**, d'**IL-8** et de **CCL5** par les mastocytes (Sanderson, 1992; Levi-Schaffer et al., 1998; Lampinen et al., 1999; Shakoory et al., 2004). Une fois recrutés depuis les vaisseaux sur le site d'inflammation, l'expression constitutive de **ST2** à leur surface les rend directement sensibles à l'**IL-33** qui est nécessaire à leur migration et à leur survie au niveau des poumons. En accord avec le rôle majeur de l'**IL-33** sur les éosinophiles, une analyse transcriptomique a permis d'identifier plus de 500 gènes différentiellement exprimés dans ces cellules en réponse à l'**IL-33** (Wen et al., 2013; Bouffi et al., 2013). En effet, l'activation des éosinophiles par l'**IL-33** induit une augmentation des molécules d'adhérence **ICAM-1** et **CD11b**, de la protéine anti-apoptotique **Bcl-xl** et potentialise leur sécrétion d'**IL-6**, **IL-4**, **IL-13**, **CXCL8**, **CCL2** et **GM-CSF** (Suzukawa et al., 2008b; Chow et al., 2010; Bouffi et al., 2013; Willebrand and Voehringer, 2016). Ainsi, l'**IL-33** est un activateur très puissant des éosinophiles, et peut induire jusqu'à 10 fois l'effet de l'**IL-4** sur l'expression de gènes pro-inflammatoires (Bouffi et al., 2013). Ces cytokines agissent de manière autocrine mais également paracrine pour induire le recrutement et la différenciation des macrophages, des LTh2 ou des neutrophiles (Jacobsen et al., 2015; Stolarski et al.,

2010). L'IL-33 est également un puissant inducteur de la **dégranulation** et de la libération de **superoxydes** par les éosinophiles (Cherry et al., 2008). Enfin, les éosinophiles recrutés et activés au niveau du site de l'inflammation produisent également de l'**eotaxine**, chimio-attractant qui permet le recrutement d'autres cellules effectrices telles que les basophiles, les mastocytes, les LTh2 ou les éosinophiles eux-mêmes (Ugucioni et al., 1997; Romagnani et al., 1999; Sallusto et al., 1997; Kitaura et al., 1996; Stolarski et al., 2010). En activant les **neutrophiles**, l'IL-33 induit également la formation de **NETs** (Neutrophil Extracellular Traps), libérant ainsi de nombreux facteurs pro-inflammatoires tels que l'**IL-6**, le **TNF- α** ou encore la **myéloperoxydase MPO** (Windt et al., 2016).

A l'exception des neutrophiles, il a été observé que l'IL-33 sécrétée par les ostéoblastes dans la moëlle osseuse favorise directement la différenciation des **progéniteurs myéloïdes CD34⁺** en **éosinophiles**, **basophiles** et **macrophages** (Schulze et al., 2011; Johnston et al., 2016).

Historiquement, l'IL-33 a été identifiée comme un puissant inducteur de la production de cytokines de type-2 telles que l'**IL-4**, l'**IL-5**, l'**IL-13**, d'**IL-9** par les **LTh2**. Leur différenciation étant induite par les cellules innées, ils agissent en seconde ligne de la réponse immunitaire en permettant la production d'**IgE** par les LB ainsi que le recrutement, la maturation et l'activation de cellules effectrices telles que les **mastocytes**, les **éosinophiles** et les **basophiles** (Xu et al., 1998; Barnes, 2011). L'IL-33 induit également leur sécrétion d'**IL-31** qui recrute les **éosinophiles** (Wong et al., 2012; Zhang et al., 2008). L'IL-33 favorise aussi indirectement la **différenciation** des LTh2 en limitant la production d'**IL-12** par les **DCs** (Rank et al., 2009; Besnard et al., 2011). Enfin, au-delà de son rôle activateur, il a été observé que l'IL-33 agit comme un puissant **chimio-attractant** des LTh2 *in vitro* et *in vivo*, facilitant ainsi leur recrutement au niveau des tissus inflammés (Komai-Koma et al., 2007).

Les **ILC2** sont également une source importante d'**IL-5**, d'**IL-13** et d'**IL-6** en réponse à l'IL-33 (Moro et al., 2010; Neill et al., 2010; Price et al., 2010; Monticelli et al., 2011). Ces cytokines peuvent favoriser un environnement immunosuppresseur, en induisant la différenciation des macrophages de type **M2** capables d'activer les **Tregs** producteurs d'**IL-10**, mais également en recrutant des neutrophiles immunorégulateurs producteurs de molécules immunosuppressives telles que l'**arginase-1** (Kurowska-Stolarska et al., 2009; Besnard et al., 2015; Liang et al., 2019). Au-delà de leur activation, l'IL-33 est nécessaire au **développement** et à l'**expansion** des ILC2, probablement via un mécanisme dépendant du **TGF- β** qui augmente l'expression de ST2 sur leur **progéniteurs** (Hoyler et al., 2012; Wong et al., 2012; Wang et al., 2020). Dans ce contexte, il a été récemment montré que l'IL-33 favorise la génération d'**ILC2 inflammatoires** (Flamar et al., 2020).

Par ailleurs, l'activation des **lymphocytes B** innés de type **B1** par l'IL-33 augmente leur sécrétion d'**IL-5**, d'**IL-13** mais également d'anticorps de type **IgM** dirigés contre des antigènes exogènes ou auto-réactifs. Ces médiateurs solubles induisent la sur-activation des cellules effectrices telles que les **mastocytes**, les **éosinophiles** ou les **basophiles** ainsi que l'activation de la **voie du complément** (Komai-Koma et al., 2011; Xu et al., 2010; Miller et al., 2008).

Enfin, en favorisant une réponse de type-2, l'IL-33 exerce également un effet **antagoniste** sur la réponse de **type-1** (Xu et al., 1998; Rostan et al., 2013; Piehler et al., 2013). En accord avec ceci, le blocage de ST2 induit une réponse immunitaire de type-1 et bloque l'inflammation de type allergique (Xu et al., 1998; Coyle et al., 1999).

2.4 Régulation des cellules immunitaires de type-1

Plus tardivement, il a été suggéré que l'IL-33 joue un rôle pléiotrope en régulant également des réponses immunitaires de type-1 et notamment la réponse anti-virale. En effet, la présence d'IL-33 lors de la polarisation *in vitro* de LT **CD4**⁺ humains induit la production d'IL-4 et d'IL-13, mais également d'**IFN- γ** , suggérant ainsi la différenciation et l'activation concomitante de **LTh1** (Smithgall et al., 2008; Blom and Poulsen, 2012). *In vivo*, il a été observé qu'en contexte d'infection par **LCMV**, une sous-population de **LT CD4**⁺ exprime **ST2** et produit de l'**IFN- γ** , de l'**IL-2** et du **TNF- α** . Dans ce modèle, la déplétion de ST2 sur les LT **CD4**⁺ spécifiquement dirigés contre le virus empêche leur expansion *in vivo* et la production de cytokines de type-1, diminuant ainsi la réponse anti-virale (Baumann et al., 2015). Par ailleurs, l'étude de l'expression génique dans des cellules issues de rates de souris infectées par **LCMV** a permis d'identifier l'IL-33 et ST2 parmi les gènes les plus fortement induits par rapport aux contrôles non infectés. Dans ce modèle, la présence du virus induit d'une part la libération d'IL-33 par les **FRC**, cellules stromales des OLS ciblées par LCMV et d'autre part l'expression de ST2 sur une sous-population de **LT CD8**⁺ (20%) spécifiquement dirigés contre le virus et qui répondent à l'IL-33 par une augmentation de leur survie (**Bcl-2**) et l'activation de leurs fonctions cytotoxiques (**GrzB**, **CD107**) et sécrétrices (**IFN- γ** , **IL-2**, **TNF- α**). De manière corolaire, le blocage de l'axe IL-33/ST2 empêche leur différenciation et les souris déficientes pour l'expression de ST2 sont caractérisées par une virémie élevée et une persistance virale (Bonilla et al., 2012). Ainsi, cette étude met en évidence pour la première fois l'existence de **LT CD8**⁺ exprimant ST2 et capables de répondre à l'IL-33 pour induire une réponse anti-virale spécifique. De manière intéressante, ce mécanisme est observé uniquement en présence de virus transcriptionnellement actif et d'une charge virale basale élevée. Il a donc été suggéré que la réplication virale dans les FRC induit un signal de danger voire une nécrose responsable de la libération d'IL-33. Toutefois, il n'est pas clairement établi si les cellules qui libèrent l'alarmine doivent nécessairement être infectées, ni si la sécrétion d'IL-33 se fait par voie active ou passive par mort cellulaire. Dans une autre étude, l'IL-33 agit comme **adjuvant** dans un contexte de vaccination et favorise la mise en place d'une réponse immunitaire anti-virale spécifique médiée par les LT **CD4**⁺ et **CD8**⁺ (Villarreal et al., 2014). Par ailleurs, en contexte de greffe il a été observé que l'IL-33 active à la fois les **LT CD4**⁺ et les **LT CD8**⁺ allo-réactifs du donneur qui acquièrent l'expression de ST2 et produisent de l'**IFN- γ** . Dans ce modèle, la libération d'IL-33 est probablement induite par la destruction des cellules épithéliales au niveau des muqueuses lors des phases précoces de la GvHD (Reichenbach et al., 2015). Enfin, de manière intéressante, l'inhibition de la voie **mTOR** par la rapamycine ou le manque de nutriment bloque la prolifération et l'activité cytotoxique des LT **CD8**⁺ en réponse à l'IL-33 et induit un profil régulateur **CD8**^{low} **GrzB**^{low} **CD107a**^{low} **T-bet**^{low} **GATA3**⁺ **FoxP3**⁺ (Liang et al., 2017; Dreis et al., 2019).

2.5 Régulation des cellules NK et NKT

Il a également été rapporté que les cellules **NK** produisent de grandes quantités d'**IFN- γ** en réponse à l'IL-33, uniquement lorsque celle-ci est combinée à l'**IL-12** ou l'**IL-23**, constituant ainsi l'une des premières évidences que l'IL-33 jouerait également un rôle dans la régulation des réponses de type-1 (Smithgall et al., 2008; Bourgeois et al., 2009). Ces résultats suggèrent que l'activité biologique de l'IL-33 sur les cellules de type-1 peut être largement modulée par le contexte cytokinique, soulignant ainsi une similitude de l'IL-33 avec l'IL-18. Ces résultats ont par la suite été confirmés par d'autres groupes chez la souris (Kearley et al., 2015) puis chez l'homme où il a été démontré que l'IL-33, lorsqu'elle est combinée à l'IL-12, agit sur la production d'**IFN- γ** et de **TNF- α** par les cellules NK en activant la voie des **MAPK (p38)** (Ochayon et al., 2020). La réponse des cellules NK circulantes

nécessite l'induction de l'expression de l'ARNm codant **ST2**, notamment en réponse à **IL-12** (Smithgall et al., 2008). Toutefois, bien qu'elles répondent à l'IL-33, l'expression protéique de ST2 à la surface des cellules NK humaines n'a encore jamais été démontrée à ce jour (Smithgall et al., 2008; Ochayon et al., 2020). Les bases moléculaires de l'expression de ST2 et de l'activation des cellules NK par l'IL-33, ainsi que les conséquences de cette activation sur leurs fonctions cytotoxiques et sécrétrices *in vitro* et *in vivo* demeurent donc peu explorées à ce jour. Le rôle de l'axe IL-33/ST2 sur l'activité des cellules NK en contexte tumoral sera discuté dans la suite de ce manuscrit.

Enfin, exprimant ST2 de manière constitutive, les cellules **NKT** sont également sensibles à l'IL-33 qui potentialise leur expansion et leur activation *in vitro* et *in vivo*. De manière intéressante, l'IL-33 active à la fois la production d'**IL-4** et d'**IFN- γ** par les cellules NKT. Comme pour les cellules NK, l'effet de l'IL-33 sur la production d'**IFN- γ** par les cellules NKT est potentialisé en présence d'IL-12 (Smithgall et al., 2008; Bourgeois et al., 2009).

2.6 Régulation des lymphocytes Th17

Un faisceau d'arguments indique à ce jour que l'IL-33 régule également la réponse de type **Th17**. Tout d'abord, l'IL-33 est impliquée de manière indirecte dans la différenciation Th17, en stimulant la production d'**IL-6** et d'**IL-1 β** , par les mastocytes (Cho et al., 2012) ou les DCs (Park et al., 2017), responsables de la différenciation de lymphocytes Th17 *in vivo*. Par ailleurs, des corrélations positives ont été observées entre les concentrations sériques d'IL-33, d'IL-4, d'**IL-17A**, la présence d'autoanticorps et de marqueurs d'atteinte hépatique chez des patients atteints d'une pathologie auto-immune du foie (Liang et al., 2018). Une corrélation a également été observée entre les concentrations sériques d'IL-33 et d'**IL-17A** chez des patients atteints d'asthme et de rhinites d'origine allergique (Vocca et al., 2015). Dans des modèles murins de pathologies auto-immunes, la neutralisation de l'axe IL-33/ST2 induit une diminution de la concentration sérique d'IL-17A associée à une amélioration des paramètres cliniques, sans toutefois démontrer un rôle direct de l'IL-33 dans ces processus (Xu et al., 2008). Par ailleurs, plusieurs études ont rapporté l'existence de cellules **Th17 ST2⁺** *in vivo* au niveau des muqueuses nasales et intestinales (Lam et al., 2016; Pascual-Reguant et al., 2017). Dans la muqueuse nasale, l'IL-33 agit directement sur les lymphocytes **Th17 ST2⁺** pour induire leur trans-différenciation en **LTh2** producteurs d'**IL-5** et d'**IL-13**, responsables du développement de rhinites chroniques (Lam et al., 2016). Dans la muqueuse intestinale, l'IL-33 inhibe la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-17, IFN- γ , TNF- α) par les **Th17 ST2⁺** et favorise leur différenciation en **Th17 régulateurs** producteurs d'**IL-10** (Pascual-Reguant et al., 2017). Dans ces études, l'IL-33 agit au contraire plutôt comme un frein de la réponse Th17. Ainsi, son rôle sur la régulation de la réponse Th17 semble dual et largement dépendant du contexte cellulaire et physiopathologique.

2.7 IL-33 et lymphocytes T régulateurs

Une littérature récente et abondante démontre que l'IL-33 agit également sur les **Tregs**. Tout d'abord l'IL-33 favorise indirectement l'accumulation et la prolifération des Tregs, d'une part via la **production d'IL-2** par les mastocytes (Morita et al., 2015) et d'autre part via l'**IDO** et le **TGF- β** sécrétés par les **DCs CD103⁺** activées (Duan et al., 2012). Par ailleurs, l'IL-33 favorise leur expansion et leur survie via l'activation des **ILC2 ICOS-L⁺** capables d'interagir avec les Tregs ICOS⁺ résidents des tissus (Molofsky et al., 2015; Smigiel et al., 2014) mais également en favorisant la polarisation des macrophages de type M2 sécréteurs d'IL-10 (Nascimento et al., 2017).

Par ailleurs, de nombreuses études ont récemment rapporté l'existence d'une population de Tregs exprimant **ST2** de manière constitutive, observée dans le **thymus** et la **rate** (Matta et al., 2014; Turnquist et al., 2011) mais également dans les tissus non lymphoïdes tels que le **côlon** et les **intestins** (Pastille et al., 2019; Schiering et al., 2014), les **poumons** (Arpaia et al., 2015) ou encore les **muscles** (Burzyn et al., 2013; Kuswanto et al., 2016) et enfin particulièrement enrichie dans le **tissu adipeux viscéral** (Visceral Adipose Tissue, **VAT**) (Kolodin et al., 2015; Molofsky et al., 2015; Vasanthakumar et al., 2015). Ainsi, l'IL-33 induit directement leur prolifération, de manière supérieure et indépendante de l'IL-2 et est nécessaire à leur maintien et leur fonctionnalité *in vivo* (Schiering et al., 2014; Vasanthakumar et al., 2015; Alvarez et al., 2019a). Dans le tissu adipeux, l'augmentation de l'expression d'IL-33 dans les adipocytes avec l'âge corrèle avec une augmentation du nombre de Tregs ST2⁺ dans ce tissu, confirmant que l'IL-33 participe au développement et au maintien de cette population (Wood et al., 2009; Kolodin et al., 2015; Vasanthakumar et al., 2015; Molofsky et al., 2015).

Ces Tregs ST2⁺ résidents des tissus sont caractérisés par un programme transcriptionnel et épigénétique unique qui les distingue des Tregs circulants. En effet, ils présentent un ensemble de méthylations de l'ADN qui leur sont propres et l'expression des facteurs de transcription **GATA3**, **BATF** et **IRF4** qui régulent directement leur différenciation ainsi que l'expression de ST2. L'expression de **Blimp-1** leur permet de maintenir une expression forte de **GATA-3** et **FoxP3** (Vasanthakumar et al., 2015; Delacher et al., 2017, 2020).

Phénotypiquement, ils sont caractérisés par l'expression de **KLRG1**, **CCR2**, **CD69**, **PD-1**, **TIGIT**, **OX-40** et **PPAR-γ**. Ils produisent de l'**IL-10** et du **TGF-β** en réponse à l'IL-33 et ont donc un effet suppressif sur la réponse adaptative (**LT CD4⁺ CD8⁺**, **LB**) et innée (**neutrophiles**, **M1 macrophages**) (Schiering et al., 2014; Vasanthakumar et al., 2015; Molofsky et al., 2015; Brunner et al., 2011; Matta and Turnquist, 2016; Siede et al., 2016; Li et al., 2019a). Ils produisent également de l'amphiréguline (AREG) et jouent donc un rôle majeur dans la réparation tissulaire (Burzyn et al., 2013; Arpaia et al., 2015). De manière intéressante, il semblerait que l'orientation des **Tregs ST2⁺** vers une fonction **suppressiv**e ou **réparatrice** serait respectivement dépendante d'une activation par un signal **TCR** ou par des cytokines telles que l'**IL-33** ou l'**IL-18**, bien que les deux signaux et fonctions ne semblent pas exclusifs (Arpaia et al., 2015; Vasanthakumar and Kallies, 2015).

Les Tregs ST2⁺ peuvent être issus des Tregs différenciés dans le **thymus** (**tTregs Helios⁺**) ou de Tregs **périphériques** (**pTregs Helios⁻**) (Schiering et al., 2014; Kolodin et al., 2015; Feuerer et al., 2009). Ils peuvent également être naturellement induits à partir de Tregs de la **rate** ou des **OLS** (pTregs) ou se différencier à partir des **LT CD4⁺ Foxp3⁻** non régulateurs en réponse à l'IL-33 (Turnquist et al., 2011; Vasanthakumar et al., 2015; Schiering et al., 2014; Delacher et al., 2020). Des résultats contradictoires sur la nécessité de l'**IL-33** ou d'un signal **TCR** pour permettre leur développement ont été rapportés, sachant que ces deux voies sont capables d'induire l'expression de **GATA3**, **BATF** et **IRF4** (Vasanthakumar et al., 2015; Kolodin et al., 2015; Siede et al., 2016). Ils sont caractérisés par un répertoire **TCR** plus restreint que les Tregs des organes lymphoïdes et prolifèrent par expansion clonale (Feuerer et al., 2009; Kolodin et al., 2015). Ainsi, il semblerait que leur origine soit diverse, suggérant plutôt un modèle d'acquisition de ST2 en réponse à divers contextes et signaux activateurs tels que des cytokines ou un panel d'antigènes restreint. De manière intéressante, contrairement à ce qui a été décrit pour les cellules de type-1, l'**IL-23** inhibe l'expression de ST2 sur les Tregs en inhibant **GATA3** via l'activation de la voie **STAT-3** (Schiering et al., 2014). Ces résultats suggèrent que l'IL-23, lorsqu'elle est associée à l'IL-33, favorise conjointement une réponse de type-1 d'une part et limite l'activité des Tregs suppresseurs d'autre part. Enfin, une étude publiée cette année montre que l'IL-33 est essentielle au maintien de l'identité et des fonctions effectrices des Tregs. En effet, l'expression d'IL-33 dans les Tregs est nécessaire pour empêcher l'expression d'**IFN-γ** en bloquant l'accessibilité de nombreux gènes dont celui de l'**IFN-γ** mais également en inhibant la voie **NF-κB** et ses cibles telles que

T-bet. De manière frappante, cette régulation de l'état transcriptionnel et épigénétique des Tregs est indépendante de l'expression et de la fonction de ST2, en faveur d'un rôle nucléaire de l'IL-33 (Hatzioannou et al., 2020).

2.8 Régulation des autres cellules immunitaires

Comme évoqué précédemment, l'IL-33 favorise la maturation des **DCs** qui se traduit par l'augmentation de leur expression de **CD80/86** et de **CMH-II** et de leur production d'**IL-6** pour permettre la différenciation des **LTh2** (Rank et al., 2009). Toutefois, dans certains contextes, l'IL-33 peut induire l'expansion spécifique de **DCs CD11c⁺ CMH-II^{faible} PD-L1⁺ PD-L2⁺** immatures moins performantes pour réaliser la présentation antigénique et de **MDSCs CD11b⁺ GR-1^{int}** suppressives des fonctions effectrices des LT (Mayuzumi et al., 2009; Turnquist et al., 2011; Brunner et al., 2011; Matta and Turnquist, 2016). Ce mécanisme est dépendant de la production de GM-CSF (Mayuzumi et al., 2009).

L'IL-33 agit également de manière autocrine et paracrine sur les **macrophages** pour potentialiser leur activation et leur production de **TNF- α** et d'**IL-6** en réponse à une stimulation par le **LPS**, en augmentant l'expression des récepteurs de ce dernier (**TLR4** et **MD2**) (Espinassous et al., 2009). De même, l'IL-33 potentialise directement l'activation et la production de cytokines pro-inflammatoires (**TNF- α** , **IL-6**, **IL-1 α**) par les cellules de la **microglie** en réponse au LPS, favorisant ainsi le recrutement des lymphocytes et des neutrophiles dans le cerveau en conditions inflammatoires (Cao et al., 2018).

2.9 Régulation des cellules non-immunitaires

Par ailleurs, l'IL-33 agit également sur les cellules stromales pour faciliter la mise en place des réponses immunitaires. Ainsi, elle facilite l'adhérence de cellules immunitaires en augmentant l'expression de **ICAM-1** et **VCAM-1** à la surface des cellules **endothéliales** (Choi et al., 2012; Cao et al., 2018). En interagissant avec leurs ligands respectifs, ces molécules d'adhérence vont également promouvoir la prolifération et les fonctions effectrices des cellules immunitaires (Hamawy et al., 1994).

Le rôle de l'IL-33 sur les cellules tumorales sera plus largement présenté à la fin de ce chapitre.

En conclusion, l'IL-33 est une cytokine hautement polyvalente dont l'orientation dépend du contexte cellulaire, cytokinique et physio-pathologique local.

V. Rôles de l'IL-33 en physiopathologie

1. Pathologies non tumorales

Comme présenté dans le paragraphe précédent, l'IL-33 en tant qu'alarmine induit des réponses immunitaires très puissantes et efficaces qui permettent de maintenir l'homéostasie mais peuvent être à l'origine de l'étiologie et de l'évolution de nombreuses pathologies. Ainsi, des études de l'association d'allèles (Genome-Wide Association Study, **GWAS**) réalisées chez des patients ont

montré l'existence de variants des gènes IL-33 et ST2 préférentiellement associés au développement d'**asthme**, de **pathologies inflammatoires de l'intestin**, de **diabète de type-2** ou de **dermatites** (Ho et al., 2013; Grotenboer et al., 2013; Latiano et al., 2013; Wen et al., 2015; Shimizu et al., 2005).

En effet, en favorisant une réponse immunitaire de **type-2**, l'axe IL-33/ST2 joue un rôle **protecteur** dans la réponse contre certaines **infections parasitaires** et **bactériennes** (Frisbee et al., 2019; Humphreys et al., 2008), dans l'**athérosclérose** ou les **greffes cardiaques** (Miller et al., 2008; Yin et al., 2010). Par ailleurs, il semblerait que l'activation des **ILC2** du tissu adipeux par l'IL-33 joue un rôle protecteur contre l'**obésité** et le développement de pathologies métaboliques telles que le **diabète** en induisant des modifications métaboliques dans les adipocytes (Brestoff et al., 2015; Lee et al., 2015). En revanche, elle peut également **aggraver** de nombreuses pathologies associées à des réponses de type-2 accrues telles que les **réactions allergiques** (Kurowska-Stolarska et al., 2008), l'**asthme** (Smith, 2010; Akbari, 2006), les **dermatites atopiques** (Imai et al., 2013; Imai, 2019), l'**arthrite rhumatoïde** (Xu et al., 2008), les **pathologies inflammatoires des intestins** (Pastorelli et al., 2010; Beltrán et al., 2010) ou les **infarctus** (Abston et al., 2012).

L'IL-33 participe également à la mise en place d'une réponse **anti-virale** efficace en activant les cellules immunitaires de **type-1** (LTh1 et CD8⁺) et les cellules NK. Toutefois, comme pour les réponses de type-2, elle joue un rôle **délétère** dans les conditions pathologiques caractérisées par une inflammation de type-1 excessive telles que les bronchopneumopathies chroniques obstructives (**COPD**), l'**hypernociception** ou la réponse de type **GvHD** (Kearley et al., 2015; Verri et al., 2008; Reichenbach et al., 2015).

L'impact de l'IL-33 sur les pathologies associées à une réponse **Th17** semble plus complexe et demeure encore largement non résolu. En contexte **allergique** ou de **pathologies auto-immunes** des articulations ou du foie, l'IL-33 joue un rôle **défavorable** en soutenant l'action de **LTh17 pathologiques** ou au contraire en induisant leur différenciation en **LTh2 pro-inflammatoires** (Vocca et al., 2015; Lam et al., 2016; Xu et al., 2008; Liang et al., 2018). A l'inverse elle joue un rôle **favorable dans des modèles d'EAE** en induisant la différenciation des LTh17 pathologiques en **LTh2** (Xu et al., 2008; Liang et al., 2018; Jiang et al., 2012). Enfin, en favorisant la différenciation des LTh17 inflammatoires en **LTh17 tolérogènes**, elle diminue l'inflammation locale et participe au maintien de l'**homéostasie** dans la muqueuse intestinale (Pascual-Reguant et al., 2017).

L'expansion et l'activation de cellules immunosuppressives telles que les **Tregs**, les **DCs CD11c⁺** immatures ou encore les **MDSCs CD11b⁺ GR-1^{int}** en réponse à l'IL-33 joue un rôle **protecteur** en diminuant l'inflammation en contexte **allergique** (Morita et al., 2015), d'**inflammation intestinale** (Duan et al., 2012; Schiering et al., 2014), d'**obésité** et de diabète de type-2 (Vasanthakumar et al., 2015) ou en favorisant la tolérance dans un contexte de **greffe** cardiaque ou de cellules souches hématopoïétiques allogéniques (Brunner et al., 2011; Turnquist et al., 2011).

En outre, la production d'**AREG** par les **Tregs ST2⁺** ou par les **ILC2** en réponse à l'IL-33 participe à la restauration des épithélia pulmonaires, intestinaux ou de la peau et du tissu musculaire suite à des dommages induits par un allergène, une infection ou un stress. De manière corolaire, l'IL-33 peut favoriser la **fibrose** observée en réponse à une réparation tissulaire trop importante (Arpaia et al., 2015; Zaiss et al., 2015; Monticelli et al., 2011; Rak et al., 2016).

Enfin, la sécrétion de sST2 est induite par l'inflammation au niveau **local** dans les **poumons**, le **cerveau** ou les **intestins** (Mildner et al., 2010; Kanda et al., 2006; Pastorelli et al., 2010) ou **systémique** dans le **sérum** de patients atteints d'affections **pulmonaires** (Oshikawa et al., 2002; Hacker et al., 2009; Watanabe et al., 2018), **cardiaques** (Zhang et al., 2012a; Demyanets et al., 2014), **intestinales** (Pastorelli et al., 2010), **hépatiques** (Gao et al., 2015), **cutanées** (Mok et al., 2010; Zhang et al., 2018c) ou **articulaires** (Ishikawa et al., 2013), d'**allergies** (Untersmayr et al., 2005), de **choc septique** (Brunner

et al., 2004), d'**infections virales** (Becerra et al., 2008) ou de **GvHD** (Reichenbach et al., 2015). La sécrétion de sST2 peut avoir un rôle protecteur en limitant l'inflammation en condition d'hypertension artérielle pulmonaire ou d'inflammation intestinale (Shao et al., 2014; Pastorelli et al., 2010). A l'inverse, sST2 joue un rôle défavorable en limitant l'action protectrice ou pro-inflammatoire de l'IL-33 en contextes d'insuffisance cardiaque chronique et d'infarctus, ou en contexte tumoral (Zhang et al., 2012a; Demyanets et al., 2014; Serrels et al., 2017). Ainsi, il semblerait que l'impact de sST2 dépende du ratio IL-33/sST2 et du rôle de l'IL-33 dans l'étiologie de la pathologie considérée et sST2 est utilisé comme **bio-marqueur** dans la détection, le suivi et l'évaluation du pronostic vital des patients atteints de ces pathologies chroniques ou aiguës.

2. L'axe IL-33/ST2 en contexte tumoral

Le développement tumoral s'accompagne de nombreux **stress cellulaires** et **tissulaires** tels que la **nécrose**, la **pression mécanique**, l'**hypoxie**, la **privation de nutriments** ou encore la présence de **cytokines pro-inflammatoires** pouvant induire la sécrétion ou la libération d'IL-33 dans le microenvironnement tumoral. De par son rôle dans la modulation des réponses immunitaires et des processus de cicatrisation et de réparation tissulaire tels que l'angiogenèse, la production de composés de la matrice ou encore la fibrose ; l'axe IL-33/ST2 va participer à la régulation de la tumorigénèse. Ainsi, des rôles pro- et anti-tumoraux, dépendants du système immunitaire ou non ont été mis en évidence et l'importance de l'axe IL-33/ST2 en contexte tumoral sera discutée dans cette dernière partie.

2.1 Expression de l'axe IL-33/ST2 dans les tumeurs

2.1.1 Expression d'IL-33 dans les tumeurs

L'expression d'**IL-33** est plus élevée dans les tumeurs du **poumon** (Hu et al., 2013), de la **tête et du cou** (Chen et al., 2013), du **sein** (Liu et al., 2014a; Hu et al., 2017a), du **côlon** (Maywald et al., 2015), du **foie** (Zhang et al., 2012c; Yang et al., 2016), de l'**ovaire** (Saied and El-Etreby, 2017), du **col de l'utérus** (Wu and Zhang, 2016), du **pancréas** (Moral et al., 2020) ainsi que dans les **mélanomes** (Hatzioannou et al., 2020) par rapport au tissu sain correspondant et augmente généralement avec le stade tumoral. L'expression d'IL-33 est également augmentée dans les cellules de la moelle chez les patients atteints de tumeurs d'origine hématologique (Mager et al., 2015). Ainsi, l'expression **locale** d'IL-33 peut augmenter au cours de la tumorigénèse, et est observée tant dans la **tumeur primaire** que dans les **ganglions drainants** et dans les **métastases** (Maywald et al., 2015; Tong et al., 2016). En accord avec ces observations, un taux élevé d'IL-33 corrèle avec le développement de **métastases** dans les cancers du foie (Zhang et al., 2012c; Tong et al., 2016), de l'ovaire (Saied and El-Etreby, 2017) ou le mélanome (Hatzioannou et al., 2020). Enfin, un variant allélique dans le gène IL-33 responsable d'une diminution de l'expression d'IL-33 a été associé à une plus faible incidence de cancer colorectal (Li et al., 2019c).

La concentration d'IL-33 semble également plus élevée dans le **sérum** des patients atteints de divers cancers (Hu et al., 2013; Kim et al., 2015a; Zeng et al., 2016; Liu et al., 2014a; Yang et al., 2015a; Sun et al., 2011; Hu et al., 2017b). En accord avec ces observations, il a été suggéré que l'IL-33 sérique pouvait constituer un bon marqueur pour le diagnostic non invasif de ces tumeurs (Hu et al., 2013; Yang et al., 2015a). Toutefois, considérant la complexité de la régulation de l'axe IL-33/ST2 en contexte tumoral mais également dans d'autres pathologies, l'utilisation de ces marqueurs à des fins de diagnostic clinique primaire semble limitée. Malheureusement, peu de ces études ont adressé la fonctionnalité de l'IL-33 sérique en contexte tumoral.

Les cellules **stromales** présentes dans le microenvironnement tumoral expriment l'IL-33 de manière constitutive et représentent donc une source non négligeable d'IL-33 dans le microenvironnement tumoral. Ainsi, l'expression d'IL-33 a été rapportée dans les **fibroblastes** présents dans les tumeurs (Cancer Associated Fibroblasts, CAFs) de la tête et du cou et du pancréas ainsi que dans les **myofibroblastes** de la muqueuse intestinale (Chen et al., 2013; Andersson et al., 2018; Maywald et al., 2015). Les **cellules endothéliales** et les **péricytes** constituent également une source importante d'IL-33 dans la tumeur (Cui et al., 2015; Mager et al., 2015; Andersson et al., 2018). De manière intrigante plusieurs groupes ainsi que des résultats obtenus au cours de ma thèse rapportent une perte d'expression de l'IL-33 nucléaire dans les vaisseaux présents dans les tumeurs (Küchler et al., 2008; Maywald et al., 2015). Par ailleurs, il a été observé que l'expression nucléaire de l'IL-33 est très rapidement perdue dans les cellules endothéliales en réponse au **VEGF** ou au **TNF- α** *in vitro*, ou au cours de l'angiogenèse ou de la réparation tissulaire (Küchler et al., 2008). Ainsi, la perte d'IL-33 nucléaire dans les vaisseaux intra-tumoraux pourrait être un indicateur de **néo-angiogenèse** locale.

Enfin, dans certaines tumeurs d'origine **épithéliale** telles que les tumeurs des intestins (Maywald et al., 2015), du côlon (Cui et al., 2015) ou de la tête et du cou (Rössle et al., 2016), l'expression d'IL-33 basale peut être fortement augmentée voire acquise dans les **cellules épithéliales transformées**, constituant potentiellement une source massive d'IL-33. Ainsi, l'expression d'IL-33 est fortement induite *in vitro* et *in vivo* dans plusieurs lignées tumorales en réponse à l'**IL-1 β** , au **TNF- α** , ou à l'**IL-6**, mimant ainsi les signaux pro-inflammatoires pouvant être présents au stade pré-tumoral (Zhang et al., 2017). De manière intéressante il a été observé que la présence de **bactéries** dans les poumons pouvait directement induire l'expression d'IL-33 dans les cellules épithéliales tumorales (Sun et al., 2018). Cette expression peut être **nucléaire** mais également **cytoplasmique**; et certaines études ont corrélé l'augmentation de l'IL-33 sérique avec la diminution du marquage nucléaire sur les coupes de tumeurs (Maywald et al., 2015; Yang et al., 2016; Hu et al., 2017b).

Paradoxalement, plusieurs études rapportent une **diminution** significative de l'expression d'IL-33 dans les **cellules tumorales** et dans le **sérum** aux stades **tardifs** dans les cancers du côlon (Cui et al., 2015; Zhang et al., 2017), des intestins (Mertz et al., 2016), du poumon (Kim et al., 2015b; Akimoto et al., 2016), de la prostate (Saranchova et al., 2016) ou de l'utérus (Wang et al., 2014b), avec dans certains cas un niveau inférieur aux contrôles.

En conclusion, le niveau d'IL-33 cellulaire et sérique semble largement modulé, suggérant un rôle **dynamique** et **versatile** de l'IL-33 au cours des différents stades de la tumorigenèse. Par ailleurs, son oxydation rapide dans le milieu extracellulaire (Cohen et al., 2015) ou son interaction avec sST2 (Hayakawa et al., 2007) affectent l'activité biologique de l'IL-33 mais pourraient également interférer avec sa détection.

2.1.2 Expression de ST2 dans les tumeurs

Comme pour l'IL-33, les cellules **tumorales** et **stromales** peuvent également acquérir l'expression de ST2 en réponse à un signal **pro-inflammatoire** ou **oncogénique** (Levescot et al., 2014; Maywald et al., 2015). Par exemple, ST2 est directement induit par l'expression de la protéine oncogénique **BCR-ABL** dans les **progéniteurs leucémiques CD34⁺** (Levescot et al., 2014). Dans le cancer du côlon, l'acquisition de l'expression de ST2 sur les cellules tumorales est observée uniquement au stade tardif de carcinome (Maywald et al., 2015). A l'inverse, certaines études ont rapporté une **diminution** de l'expression de ST2 au cours de la tumorigénèse chez des patients atteints de cancers du poumon ou du côlon (Akimoto et al., 2016; O'Donnell et al., 2016).

Par ailleurs, comme présenté précédemment, de nombreuses cellules **immunitaires** exprimant ST2 à l'état basal ou induit en réponse à des stimuli sont capables d'infiltrer les tumeurs et sont donc sensibles à l'IL-33 présente dans l'environnement. L'ensemble de ces cellules immunitaires ST2⁺ et leurs fonctions dans la réponse immunitaire anti-tumorale seront plus largement discutés dans la suite de ce paragraphe.

Enfin, l'augmentation de **sST2** dans le sérum a été rapportée chez les patients atteints de cancers du sein, du foie ou de néoplasmes myéloprolifératifs ; et corrèle généralement avec un mauvais pronostic (Lu et al., 2014; Yang et al., 2015a; Bergis et al., 2013; Levescot et al., 2014). De manière intéressante, sST2 est l'un des gènes les plus fortement induits dans les cellules mammaires suite à l'expression de l'oncogène ErbB2 (**Her2**), et l'expression de sST2 est associée à une plus grande mobilité des cellules tumorales *in vitro* et corrèle avec la présence de métastases chez les patients (Gillibert-Duplantier et al., 2012).

2.2 Régulation de la tumorigénèse et impact pronostique

Les modèles de souris déficientes pour l'expression d'IL-33 ou de ST2, de manière systématique ou restreinte à un sous-type cellulaire ainsi que des modèles d'induction d'expression d'IL-33 ou d'administration d'IL-33 exogène, ont permis de mettre en évidence différentes voies de régulation de la tumorigénèse par l'IL-33. Ces effets sont principalement médiés par son activité d'alarmine plutôt qu'à travers son activité de facteur nucléaire ; et tant l'expression stromale que tumorale et immunitaire d'IL-33 et de ST2 sont impliquées (Maywald et al., 2015; Yu et al., 2015; Wang et al., 2016; Mertz et al., 2016; Zhang et al., 2017; Jin et al., 2018). Ainsi, la compréhension du rôle de l'axe IL-33/ST2 dans la régulation de la tumorigénèse se heurte au pléiotropisme de cette voie. Toutefois, certains mécanismes sous-jacents ont été identifiés et sont présentés dans cette partie ainsi que dans la figure **23**.

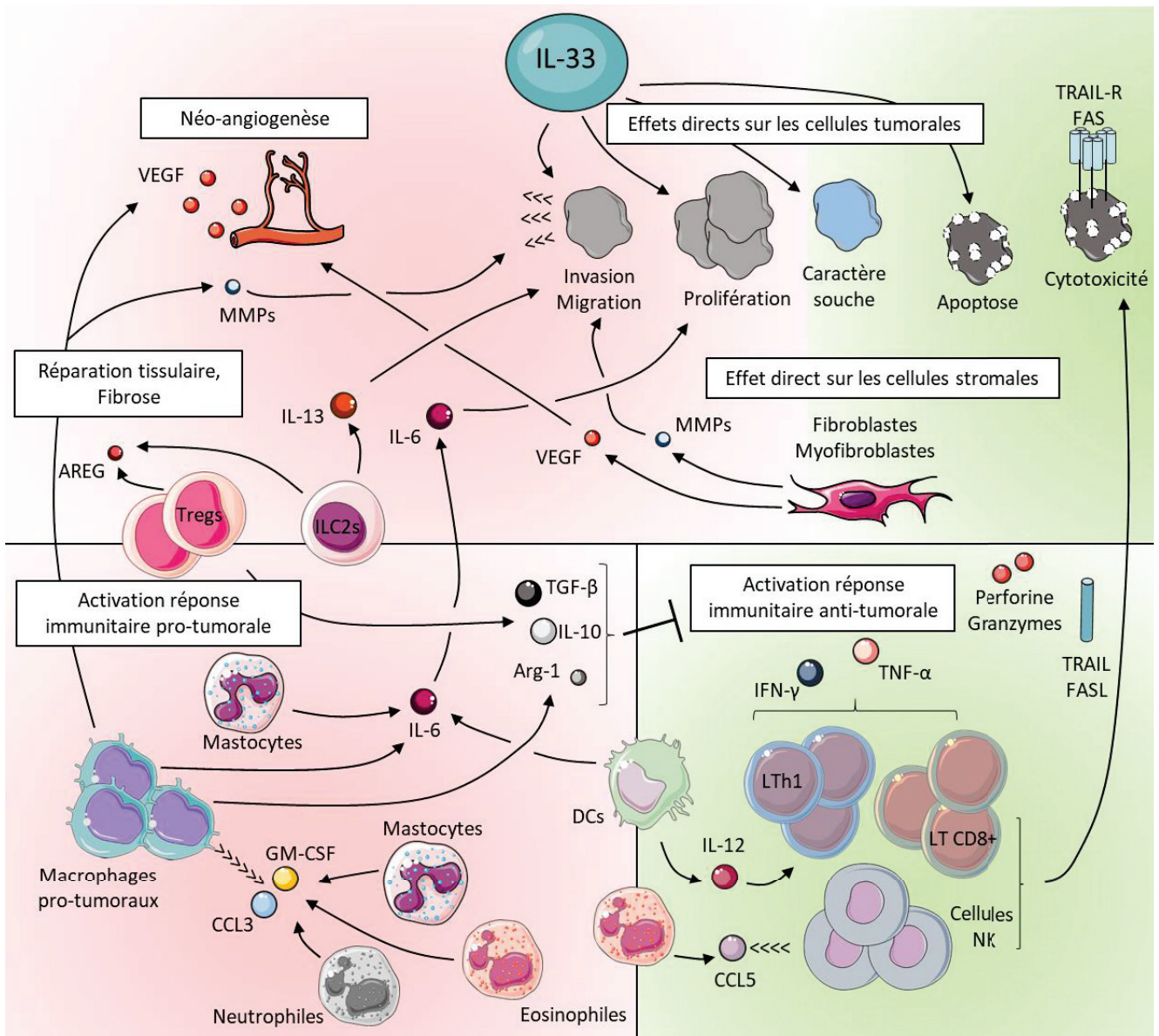


Figure 23. L'IL-33, une cytokine duelle en contexte tumoral

L'IL-33 régule la tumorigénèse par de multiples mécanismes et son impact sur la croissance tumorale reste aujourd'hui controversé. Ainsi, elle peut promouvoir la croissance tumorale en agissant directement sur les cellules tumorales pour favoriser leur migration, leur prolifération et leur phénotype de cellule souche. Elle agit également sur les cellules stromales telles que les fibroblastes et les myofibroblastes pour permettre la sécrétion de médiateurs solubles tels que les métalloprotéinases de type MMPs qui favorisent la migration des cellules tumorales ou du VEGF qui favorise l'angiogénèse. Enfin, elle active de nombreuses cellules immunitaires (macrophages pro-tumoraux, Tregs, ILC2, mastocytes, éosinophiles, neutrophiles) qui favorisent la croissance tumorale en sécrétant des facteurs pro-tumoraux (VEGF, MMPs, Arginase-1, IL-6, TGF-β, IL-10). A l'inverse, elle peut induire l'activation des cellules immunitaires de type-1 (LTh1, LT CD8⁺, cellules NK) associées à une réponse immunitaire anti-tumorale (IFN-γ, TNF-α, cytotoxicité). Enfin, elle peut directement induire la mort par apoptose des cellules tumorales. AREG : Amphiréguline, MMPs : Métalloprotéinases.

2.2.1 Rôle dual de l'IL-33 dans la régulation de la réponse immunitaire en contexte tumoral

De par son rôle ambivalent, l'IL-33 joue un rôle dual dans la régulation de la réponse immunitaire en contexte tumoral.

a) L'IL-33, régulatrice de l'immunité pro-tumorale

Tout d'abord, en favorisant l'accumulation et l'activation des **mastocytes**, des **éosinophiles**, et des **neutrophiles**, l'IL-33 favorise un environnement inflammatoire et cytokinique propice à la **transformation**, à la **croissance tumorale** et au développement de **métastases** (Gounaris et al., 2007; Ishikawa et al., 2014; Maywald et al., 2015). Par exemple, la sécrétion de **GM-CSF** et **CCL3** induite par l'IL-33 permet le recrutement de macrophages pro-tumorigéniques (Eissmann et al., 2019). L'**IL-13** produite par les ILC2 favorise le développement de **métastases** (Li et al., 2014; Jovanovic et al., 2014). L'**IL-6** produite par les mastocytes agit sur les cellules épithéliales en activant des facteurs pro-oncogéniques (Grivennikov et al., 2009) et la **prostaglandine E2** sécrétée par les macrophages agit comme **facteur de croissance** sur les cellules tumorales (Fang et al., 2017a) et inhibe la réponse immunitaire anti-tumorale. Par ailleurs, l'expression d'IL-33 dans des lignées tumorales de cœlon inoculées *in vivo* induit directement le recrutement de cellules myéloïdes immunosuppressives (**CD11b⁺ GR1⁺** et **CD11b⁺ F4/80⁺**) sécrétrices d'**IL-6**, de **TGF-β** et de molécules pro-angiogéniques (**VEGF**) favorisant ainsi la **croissance tumorale** et la **néo-angiogénèse** (Jovanovic et al., 2014; Zhang et al., 2017). L'IL-33 favorise également la différenciation de macrophages de type M2 et de cellules **CD11b⁺ F4/80⁺** producteurs d'**arginase-1** qui limite directement la réponse anti-tumorale médiée par les **LT** (Cheon et al., 2011; Andersson et al., 2018). Les macrophages M2 produisent également des **metalloprotéinases** qui favorisent le développement de métastases (Andersson et al., 2018).

L'IL-33 peut également antagoniser la réponse immunitaire anti-tumorale médiée par les cellules de type-1. Dans un modèle de cancer mammaire, les souris déficientes pour ST2 sont caractérisées par une augmentation de la sécrétion de cytokines anti-tumorales (**IFN-γ**, **IL-17**, **TNF-α**) et des fonctions cytotoxiques des **cellules NK**, responsable d'un retard du développement tumoral et des métastases. Ce travail met en lumière un rôle délétère de l'axe IL-33/ST2 dans l'immunité anti-tumorale (Jovanovic et al., 2011). De même, les souris déficientes pour l'IL-33 sont caractérisées par une augmentation de l'infiltration en **LT CD4⁺** et **CD8⁺** ou en **DCs matures**, associée à une forte production d'**IFN-γ** et à une croissance tumorale fortement réduite dans un modèle de mélanome (Hatzioannou et al., 2020). De manière corolaire, le pré-traitement des souris par des injections d'IL-33 favorise la croissance tumorale dans un modèle de mélanome métastatique en limitant l'activité cytotoxique des **LT CD8⁺** conjointement avec l'augmentation de l'activité des **Tregs** (Jevtovic et al., 2020).

En effet, l'IL-33 participe également au maintien et à l'activation des Tregs en contexte tumoral. Elle permet l'accumulation et l'activation des **Tregs** dans la tumeur, favorisant ainsi un environnement immunosuppresseur favorable à la croissance tumorale et au développement de métastases via la production d'**IL-10** notamment (Jovanovic et al., 2014; Pastille et al., 2019). Cette activation peut être directe, via l'expression de **ST2** à la surface des Tregs, ou indirecte via l'activation des **mastocytes** ou la sécrétion de **CCL5** par les **cellules tumorales** (Pastille et al., 2019; Blatner et al., 2010; Serrels et al., 2017). Toutefois, dans ce dernier cas, l'interaction des mastocytes activés et recrutés par l'IL-33 avec les Tregs dans la muqueuse intestinale induit au contraire une transition vers un phénotype de **Tregs pro-inflammatoires** producteurs d'**IL-17** qui favorisent la transformation des polypes (Blatner et al., 2010). Une étude transcriptomique comparative entre les Tregs extraits de tumeurs, du tissu normal contra-latéral ou du sang chez des patientes atteintes de cancer du sein

identifie ST2 comme un des gènes les plus fortement induits dans les Tregs infiltrant les tumeurs par rapport aux Tregs du sang, sans différence significative par rapport au Tregs issus du tissu normal. L'expression de ST2 corrèle également avec d'autres gènes associés à l'activation des Tregs et à une forte capacité suppressive. Ainsi, cette étude confirme que les **Tregs résidents** des tumeurs expriment fortement **ST2** et sont des **effecteurs** hautement **suppressifs**. Toutefois, dans cette étude, ils ne sont pas spécifiquement enrichis dans la tumeur et l'expression de ST2 ne semble pas fortement régulée en contexte tumoral (Plitas et al., 2016). A l'inverse, dans un modèle de cancer du poumon, la croissance tumorale va directement favoriser l'expansion des **Tregs ST2⁺ KLRG1⁺ AREG⁺** hautement suppressifs capables d'inhiber le recrutement et l'activation des **LT CD8⁺** ; et ce de manière dépendante de l'axe **IL-33/ST2** (Li et al., 2019a). De même, l'inflammation chronique au niveau de la peau ou du colon peut induire une augmentation locale d'IL-33 favorisant ainsi le développement et l'accumulation de Tregs ST2⁺ associés à la tumorigénèse (Ameri et al., 2019; Pastille et al., 2019). En conclusion, bien que les mécanismes sous-jacents restent encore à élucider et que leur rôle soit controversé, il semblerait que l'activation des Tregs résidents par l'IL-33 favorise la croissance tumorale.

Ainsi, ces résultats sont en faveur d'un rôle **délétère** de l'IL-33 qui soutient la réponse immunitaire **pro-tumorale** tout en inhibant la réponse anti-tumorale.

A l'inverse, il existe des arguments en faveur d'un rôle **anti-tumoral** de l'IL-33 endogène ou exogène, via la mobilisation d'une immunité anti-tumorale.

b) L'IL-33, actrice de l'immunosurveillance anti-tumorale

Tout d'abord, dans des modèles de cancer du poumon métastatique (Gao et al., 2013) ou d'hépatocarcinome (Jin et al., 2018), l'expression artificielle d'IL-33 par transfection dans des lignées cellulaires tumorales permet le recrutement des **LT CD4⁺, CD8⁺** et des **cellules NK** dans la tumeur mais également en périphérie, réduisant ainsi la croissance tumorale et la formation de métastases via l'activation des fonctions cytotoxiques et la production d'**IFN- γ** . Cet effet anti-tumoral et anti-métastatique de l'IL-33 est perdu suite à la déplétion des **LT CD8⁺** et des cellules NK (Gao et al., 2013). De même, l'injection d'IL-33 exogène favorise le recrutement et l'activation des **LT CD8⁺** et des **cellules NK**, qui inhibent la croissance tumorale et le développement de métastases respectivement (Gao et al., 2015; Qin et al., 2016). Dans un modèle d'AML, l'administration systémique d'IL-33 inhibe la progression tumorale et prolonge la survie des souris, selon un mécanisme dépendant des **LT CD8⁺**. En effet, dans ce modèle, l'IL-33 stimule la **maturation** et l'**activation** des **DCs**, favorisant ainsi leur fonction de présentation croisée des antigènes (Qin et al., 2016). Une autre étude dans le mélanome montre que l'injection d'IL-33 exogène retarde la croissance tumorale via l'accumulation intra-tumorale d'**éosinophiles** et de **LT CD8⁺** d'une part et d'autre part via la diminution des **MDSCs** (Lucarini et al., 2017). Les **éosinophiles** recrutés et activés par l'IL-33 jouent un rôle anti-tumoral en induisant d'une part la mort des cellules tumorales par **dégranulation** ; et d'autre part le recrutement des cellules **NK** via la production de **CCL5** (Lucarini et al., 2017; Andreone et al., 2019; Hollande et al., 2019; Qi et al., 2020).

En accord avec ces observations, l'IL-33 **endogène** favorise également le recrutement de **LT CD8⁺** intra-tumoraux producteurs d'**IFN- γ** et associés à une réponse anti-tumorale efficace (Xia et al., 2019). De manière intéressante, dans cette même étude, l'injection d'IL-33 **exogène** au contraire favorise le recrutement des **neutrophiles** et des **DCs** produisant de l'**IL-1 β** , de l'**IL-6** et du **TNF- α** , sans conséquence significative sur la croissance tumorale, suggérant ainsi des effets différents entre l'IL-33 endogène et exogène (Xia et al., 2019). De manière surprenante, l'expression d'IL-33 par des **LT CD8⁺**

cytotoxiques de type **effecteurs mémoires** isolés de patients atteints de carcinomes hépatiques a également été observée, identifiant ainsi un groupe de patients avec une forte réponse immunitaire anti-tumorale associée à une meilleure survie (Brunner et al., 2015).

Des effets **anti-tumoraux** de l'IL-33 via le recrutement et l'activation des **ILC2** ont également été décrits. L'expression d'IL-33 dans différentes lignées cellulaires tumorales induit un recrutement massif des **ILC2** dans les tumeurs, paradoxalement associées à une diminution drastique de la croissance tumorale. Dans cette étude, la production de **CXCL1** et **CXCL2** par les ILC2 et l'expression concomitante de **CXCR2** sur les cellules tumorales induite par l'hypoxie entraîne l'apoptose des cellules tumorales (Kim et al., 2016). De plus, dans un modèle de tumeurs du pancréas, il a été montré que l'IL-33 **endogène** favorise le recrutement et l'activation des **ILC2** impliquées dans la mise en place d'une réponse des **LT CD8⁺**, associée au contrôle de la tumeur (Moral et al., 2020).

Enfin, l'IL-33 inhibe le développement **métastatique** dans différents modèles tumoraux chez la souris. Ainsi, l'injection intrapéritonéale d'IL-33 améliore la survie et retarde l'apparition de métastases dans un modèle de cancer de l'ovaire métastatique. Cette protection est liée à la mise en place d'un environnement immunitaire de type allergique dans la cavité péritonéale, caractérisé par le recrutement et l'activation de **LT CD4⁺**, d'**éosinophiles** et de **macrophages** (Perales-Puchalt et al., 2019). De même, l'administration par voie intranasale d'IL-33 favorise le recrutement et l'activation d'**éosinophiles** dans les poumons par un mécanisme dépendant de ST2, ce qui limite le développement de métastases pulmonaires après injection intraveineuse d'une lignée de mélanome (Lucarini et al., 2017).

En conclusion, l'ensemble de ces données illustre le rôle dual de l'IL-33 sur la régulation de la réponse immunitaire en contexte tumoral, conséquence directe des fonctions pléiotropes de l'IL-33. Pour concilier ces résultats, il est possible que l'IL-33 assure des fonctions différentes voire opposées en fonction du tissu dans lequel la tumeur évolue, des cytokines présentes dans le microenvironnement tumoral mais également en fonction du stade tumoral, précoce ou avancé.

2.2.2 Effets de l'IL-33 sur les cellules tumorales

L'IL-33 exerce également un rôle direct sur les **cellules tumorales**, régulant ainsi leur **transformation**, leur **prolifération** et leur **survie**, ainsi que leurs **capacités migratoires**. Elle joue ainsi un rôle dès l'initiation de la tumorigénèse jusqu'aux stades plus tardifs.

L'IL-33 peut favoriser la **transformation** des cellules, par exemple en induisant directement l'activation de la protéine oncogénique **COT** dans les cellules épithéliales mammaires, et ce de manière dépendante de l'expression de ST2 (Kim et al., 2015a). Dans un modèle de cholangio-carcinome, l'IL-33 favorise également la transformation des cellules via l'expression de facteurs oncogéniques tels que **SOX9** dans les cellules en cours de transformation (Yamada et al., 2015). L'IL-33 favorise également le phénotype de cellules souches des cellules tumorales en permettant l'expression de gènes tels que **ALDH1A3**, **OCT4**, **NANOG** et **SOX2** dans le cancer du sein ; **NANOG**, **NOTCH3**, et **OCT3/4** dans le cancer du poumon (Hu et al., 2017a; Fang et al., 2017a). En accord avec ceci, l'IL-33 augmente l'expression de marqueurs de cellules souches cancéreuses (**CD133**, **CD44**, **CD166** et **ALDH1A1**) à la surface de cellules tumorales pulmonaires (Sun et al., 2018).

Par ailleurs, l'IL-33 favorise la **prolifération** des cellules tumorales dans des modèles de cancer du côlon, du poumon, du rein ou du foie (Wang et al., 2016; Maywald et al., 2015; Zhang et al., 2017;

Wu et al., 2018; Kohler et al., 2018). Par exemple, elle peut directement induire la prolifération des cellules tumorales colorectales en induisant l'expression de **COX2** (Li et al., 2018). Elle peut également augmenter les capacités métaboliques des cellules tumorales en augmentant l'expression du transporteur **GLUT1** ; ou via la sécrétion de facteurs de croissance (**PDGF-C**) par les cellules stromales ou par les cellules tumorales elles-mêmes (Wang et al., 2016; Sun et al., 2018; Yang et al., 2015b; Maywald et al., 2015). Enfin, l'expression de **ST2** à la surface des **progéniteurs leucémiques CD34⁺** induit la production de **GM-CSF**, **G-CSF**, **IL-6**, **IL-3** et **IL-8** en réponse à l'IL-33, soutenant ainsi leur propre prolifération et favorisant la résistance aux agents cytostatiques tels que l'Imatinib (Mager et al., 2015; Levescot et al., 2014). Toutefois, il a également été observé dans un modèle de cancer du poumon que l'IL-33 pouvait directement induire la mort des cellules ST2⁺, sélectionnant ainsi les cellules ST2⁻ caractérisées par un fort potentiel métastatique (Akimoto et al., 2016). De même, l'IL-33 peut directement inhiber la prolifération et induire la mort cellulaire par apoptose d'une lignée de cellules tumorales du pancréas *in vitro* (Fang et al., 2017b).

Elle va également réguler les capacités **invasives** des cellules tumorales en augmentant leur production de métalloprotéinases (**MMP-2**, **MMP-3**, **MMP-9**, **MMP-11**) nécessaires pour faciliter leur migration à travers la matrice extracellulaire. Elle permet également l'expression de récepteurs aux chimiokines (**CXCR4**) facilitant leur mobilisation vers d'autres tissus (Ahmad et al., 1998; Chen et al., 2013; Liu et al., 2014b; Yu et al., 2015; Wang et al., 2016).

Par ailleurs, l'IL-33 peut favoriser la production de cytokines (**IL-6**), chimiokines et de médiateurs solubles (**VEGF**, **PGE₂**, **Lactate**) par les cellules tumorales, agissant ainsi de manière **autocrine** et **paracrine** pour réguler leur prolifération, la réponse immunitaire ou encore la néo-angiogénèse (Yamada et al., 2015; Yang et al., 2015a; Yu et al., 2015; Liu et al., 2014b; Zhang et al., 2017; Li et al., 2018; Andreone et al., 2019). Toutefois, dans un modèle de cancer du côlon, la production de **CCL2** par les cellules tumorales en réponse à l'IL-33 est associée à une diminution de la croissance tumorale via le recrutement de macrophages assurant un rôle anti-tumoral dans cette étude (O'Donnell et al., 2016).

Enfin, l'IL-33 peut également moduler l'**immunogénicité** des cellules tumorales, par exemple en diminuant l'expression de **Rae-1**, ligand de **NKG2D**, leur permettant ainsi d'échapper à la reconnaissance par les cellules NK (Mishra et al., 2013). A l'inverse, il a été démontré que l'IL-33 maintient directement l'expression du **CMH-1** à la surface des cellules tumorales, favorisant ainsi leur immunogénicité et l'activation des **LT CD8⁺** spécifiquement dirigés contre la tumeur. Dans ce modèle, la diminution d'expression d'IL-33 au cours de la tumorigénèse permet l'immuno-échappement et donc favorise la croissance tumorale et le développement de métastases (Saranchova et al., 2016).

2.2.3 Effets de l'IL-33 sur les cellules stromales

L'IL-33 régule également directement l'activation de nombreuses cellules **stromales non immunitaires**. Ainsi, dans un modèle organotypique de cancers de la tête et du cou, l'IL-33 produite par les **fibroblastes** associés à la tumeur augmente les capacités migratoires et l'agressivité des cellules tumorales en induisant l'**EMT** (Chen et al., 2013). Par ailleurs, les **fibroblastes** et **myofibroblastes** présents dans le micro-environnement tumoral répondent à l'IL-33 *in vitro* en sécrétant des facteurs de croissance, des facteurs pro-angiogéniques (**VEGF**) et des métalloprotéinases (**MMP-11**) favorisant la tumorigénèse en augmentant la prolifération et les capacités migratoires des cellules tumorales *in vivo* (Basset et al., 1990; Maywald et al., 2015).

Par ailleurs, il a été observé *in vitro* que l'IL-33 agit directement sur l'activation, la différenciation et la prolifération des cellules **endothéliales**, favorisant ainsi l'angiogenèse mais également la **perméabilité vasculaire** *in vivo* (Choi et al., 2012). En effet, en augmentant l'expression de facteurs induisant la **néo-angiogenèse**, tels que **VEGF** ou **PDGF-C**, l'IL-33 favorise la formation de nouveaux vaisseaux nécessaires à l'expansion tumorale et au développement de métastases (Jovanovic et al., 2014; Yang et al., 2015b; Hatzioannou et al., 2020). En accord avec cette observation, la présence d'IL-33 dans les tumeurs a été associée à une augmentation du nombre de **micro-vaisseaux sanguins** et **lymphatiques** (Ishikawa et al., 2014; Cui et al., 2015; Zhang et al., 2017).

Ces résultats, parfois contradictoires pour un type de cancer donné, peuvent s'expliquer par l'utilisation des différents modèles murins, de cellules d'origines différentes (*i. e.* lignées cellulaires ou cellules primaires) et pour les études chez l'homme par l'analyse de cohortes inévitablement différentes notamment en raison d'une prise en charge thérapeutique qui varie d'un pays à un autre.

2.2.4 Impact pronostique de l'axe IL-33/ST2 en contexte tumoral

L'expression d'IL-33 dans les tumeurs corrèle avec un **mauvais pronostic** et une **rechute** plus fréquente dans les cancers de la **tête et du cou** (Chen et al., 2013; Ishikawa et al., 2014; Wen et al., 2019), **du sein** (Yang et al., 2015b), **du côlon** (Fang et al., 2017a) et du **col de l'utérus** (Wu and Zhang, 2016). Dans le cancer du **sein**, l'IL-33 corrèle avec la résistance au traitement par le tamoxifène (Hu et al., 2017a). Un taux élevé d'IL-33 a également été associé avec le développement de **métastases** dans les cancers du **foie** (Zhang et al., 2012c), de l'**ovaire** (Tong et al., 2016; Saied and El-Etreby, 2017) ou le **mélanome** (Hatzioannou et al., 2020).

Une forte concentration en **IL-33 sérique** est également associée à un **mauvais pronostic** et généralement associée à des **stades avancés** et à la présence de **métastases** chez les patients atteints de cancers du **poumon** (Hu et al., 2013), du **sein** (Yang et al., 2015b), du **rein** (Wu et al., 2018), dans les cancers **gastriques** (Hu et al., 2017b) ou le **glioblastome** (Gramatzki et al., 2016).

Au contraire, l'expression élevée d'IL-33 corrèle avec une **meilleure survie** des patients atteints de **carcinomes hépatiques**, de cancers de la **prostate**, du **rein** ou des **glandes salivaires** (Brunner et al., 2015; Saranchova et al., 2016; Rössle et al., 2016). Par ailleurs, dans les cancers gastriques et du pancréas, il a été observé que l'IL-33 sérique diminue après traitement par chimiothérapie, pour parfois revenir à la valeur contrôle, et l'amplitude de cette diminution est associée à une meilleure survie sans progression, suggérant que la perte d'IL-33 dans le sérum est potentiellement un biomarqueur de réponse au traitement et de réponse anti-tumorale efficace (Hu et al., 2017b; Kieler et al., 2017).

Par ailleurs, l'expression de **ST2** corrèle également avec un **mauvais pronostic** dans les cancers de la **tête et du cou** (Ishikawa et al., 2014). Enfin, la concentration sérique de **sST2** est également associée à un mauvais pronostic dans les cancers du **sein** ou du **foie** (Yang et al., 2015b; Bergis et al., 2013).

Ainsi, la corrélation entre l'axe IL-33/ST2 et le pronostic semble **complexe** et très **variable** en fonction du type de cancer ou de la cellule considéré. Par exemple, dans les cancers de la tête et du cou, une forte expression nucléaire et cytoplasmique d'IL-33 dans la cellule tumorale est associée au développement de métastases et à une survie réduite, tandis qu'une expression exclusivement nucléaire indique strictement l'inverse (Chen et al., 2013; Rössle et al., 2016). Ainsi, en raison de la diversité subcellulaire, cellulaire et tissulaire de l'expression d'IL-33, l'étude de l'impact pronostique de l'IL-33 devrait quasi systématiquement tenir compte de la nature des cellules exprimant l'IL-33 et de la

localisation de ce signal pour tenter de déchiffrer l'impact de l'IL-33 sur la survie globale en contexte tumoral.

VI. L'IL-33 : nouvelle thérapie anti-tumorale ?

Comme présenté ci-dessus, les données pré-cliniques évaluant l'utilisation de l'IL-33 comme agent thérapeutique dans des modèles murins demeurent complexes, voire contradictoires selon le type de cancer ou les conditions expérimentales. A ce jour, il n'existe aucune donnée clinique sur l'utilisation d'IL-33 seule ou en combinaison avec d'autres traitements ; et le caractère **pléiotrope** et **versatile** de l'IL-33 dans de nombreuses pathologies rend son ciblage thérapeutique délicat. En effet, en tant qu'inducteur puissant de l'inflammation, le blocage de l'axe IL-33/ST2 pourrait être envisagé pour diminuer l'inflammation délétère pour le développement de certaines tumeurs. A l'inverse, en tant qu'inducteur de réponses innées et adaptatives anti-tumorales, l'IL-33 peut elle-même être envisagée comme agent thérapeutique.

Les défis de l'utilisation thérapeutique de l'IL-33 seront donc de réussir à contrôler finement la qualité et l'intensité de son activité *in vivo*, pour atteindre un objectif thérapeutique efficace tout en limitant l'induction ou l'aggravation d'autres situations pathologiques. Ceci nécessite une évaluation attentive du bénéfice par rapport au risque pour chaque pathologie voire chaque patient.

De manière préliminaire, dans des modèles pré-cliniques, l'IL-33 a démontré une activité anti-tumorale en tant qu'adjuvant dans des stratégies de vaccination anti-virale (Villarreal et al., 2014). Par ailleurs, une étude suggère une synergie entre la voie **EGF** et l'axe **IL-33/ST2** pour favoriser la croissance tumorale dans le cancer colorectal, identifiant ainsi un potentiel bénéfice thérapeutique en bloquant cet axe en combinaison avec les inhibiteurs de la voie EGF (Islam et al., 2016). A ces fins, un anticorps monoclonal antagoniste de l'IL-33 appelé **Etokimab** est actuellement en cours d'évaluation clinique dans deux essais randomisés de Phase 2a pour tester la tolérance et l'efficacité de cet agent dans des contextes allergiques (Chinthrajah et al., 2019; Chen et al., 2019), et pourrait être évalué dans des contextes tumoraux. A l'inverse, il a été observé que, injectée *in vivo*, l'IL-33 induit l'expression de **PD-L1** sur les cellules tumorales et de **PD-1** sur les **LT CD8⁺** et les **ILC2**, augmentant ainsi l'efficacité des traitements ICP anti-PD-1 dans des modèles de leucémie myéloïde (Qin et al., 2016) ou de cancer du pancréas (Moral et al., 2020). Toutefois, le bénéfice de la combinaison de ces ICP avec le ciblage de la voie IL-33/ST2 reste encore largement à adresser.

Hypothèse et Objectifs du projet de thèse

A travers leurs fonctions effectrices permettant le ciblage direct des cellules tumorales mais également leur capacité à polariser la réponse immunitaire vers une réponse anti-tumorale efficace, les cellules NK constituent une cible thérapeutique majeure pour le développement de nouvelles thérapies. Comme présenté dans l'introduction, elles font donc l'objet de nombreuses études cliniques et pré-cliniques pour lesquelles l'identification de nouveaux mécanismes d'activation ainsi que la caractérisation approfondie de la réponse des cellules NK à ces différents activateurs est un enjeu majeur. Au début de ma thèse, une littérature récente montrait que l'IL-33, connue initialement pour induire des réponses immunitaires de type-2, avait également le potentiel d'activer des cellules de l'immunité de type-1, notamment en contexte viral. Plus particulièrement, il avait été démontré que l'IL-33 pouvait induire la sécrétion d'IFN- γ par les cellules NK, participant ainsi à la réponse anti-virale. Toutefois, son activité sur les différentes fonctions effectrices des cellules NK (*i.e* cytotoxicité et sécrétion d'autres cytokines et chimiokines), la nature des cellules NK capables de répondre à l'IL-33 ainsi que les voies de signalisation impliquées demeurait très peu caractérisé. En accord avec cette observation, l'IL-33 reste à ce jour très peu utilisée dans les protocoles d'activation des cellules NK par rapport à d'autres activateurs tels que l'IL-15, l'IL-12 ou l'IL-18, que ce soit *in vitro* à des fins expérimentales ou *ex-vivo* à des fins thérapeutiques. D'autre part, bien que la compréhension de la biologie de l'IL-33 ait considérablement augmenté, l'identification des facteurs déterminant l'orientation de son activité d'alarmino pléiotrope vers une réponse immunitaire plutôt qu'une autre restait une question centrale, notamment dans les cancers où des effets anti- et pro-tumoraux de l'IL-33 avaient été décrits. **L'objectif** de mes travaux de thèse était donc de mieux caractériser l'activation des cellules NK par l'IL-33 chez l'homme et la souris, en contexte physiologique mais également pathologique dans le cancer du sein. Ainsi, nous avons émis **l'hypothèse** que l'IL-33 pourrait être impliquée dans l'immunosurveillance des cancers du sein via l'activation des fonctions effectrices des cellules NK. Cet objectif s'est orienté autour de trois axes principaux : i) identifier les conséquences de l'activation par l'IL-33 sur le phénotype et les fonctions effectrices des cellules NK, ii) comprendre les voies et les mécanismes qui régulent cette réponse et enfin iii) évaluer l'importance de l'axe IL-33/ST2/cellules NK dans la régulation de la tumorigénèse, *in silico* par l'étude rétrospective de données publiques, *ex vivo* à partir de tumeurs humaines et *in vivo* dans des modèles murins. Pour le développement de ce dernier axe, nous avons tiré profit d'un accès à des prélèvements de sang et de tumeurs issus de patientes atteintes de cancers du sein et opérées au centre Léon Bérard.

L'objectif à long terme de ce projet de thèse est d'une part de préciser le rôle de l'IL-33 au cours de la tumorigénèse et comprendre les mécanismes qui peuvent conduire à la perte de son activité anti-tumorale lorsque la tumeur progresse et d'autre part de positionner l'IL-33 en tant qu'activateur puissant des cellules NK dont l'utilisation pourrait permettre des avancées fondamentales et cliniques dans le domaine de l'immuno-oncologie.

Le cancer du sein, pathologie à laquelle nous nous sommes particulièrement intéressés, et ses spécificités sont présentés dans l'**encadré 2** ci-dessous.

Encadré 2 : Le cancer du sein

Le cancer du sein est le cancer **le plus fréquent** chez la femme (environ 20% des cancers féminins).

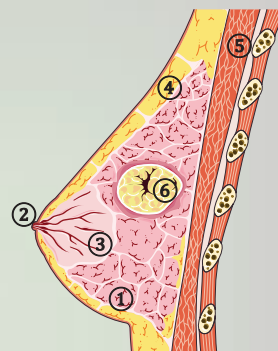
Epidémiologie du cancer du sein en France

- Plus de 50 000 nouveaux cas pour 11 900 décès annuels en France
- Age moyen de 61 ans au diagnostic, 75% se déclarent après 50 ans

Source : Institut National du Cancer (INCa)

Anatomie de la glande mammaire saine et tumorale

La glande mammaire est constituée de lobes qui se divisent eux-mêmes en lobules (1) qui produisent le lait. Le lait est acheminé jusqu'au mamelon (2) par les canaux galactophores (3). La glande mammaire est entourée de tissu adipeux (4) et de muscles (5). La tumeur (6) se développe généralement à partir des cellules épithéliales des canaux (adénocarcinome canalaire, 75% à 80%) ou des lobules (adénocarcinome lobulaire, 10 à 15%). Il existe des formes plus rares du cancer du sein : les carcinomes médullaires, mucineux, métaplasiques, tubuleux ou papillaires (10 à 15%).



Classification des cancers du sein

In situ versus infiltrants

Les cellules tumorales peuvent rester confinées à l'intérieur des canaux ou des lobules, on parle alors de cancer **in situ**. Lorsque les cellules tumorales parviennent à franchir la lame basale de l'épithélium mammaire et envahissent le tissu mammaire, on parle alors de cancer **infiltrant**. Ces cellules invasives, si elles atteignent les vaisseaux sanguins, peuvent être à l'origine de métastases dans des organes distants (os, foie, poumons le plus fréquemment).

Le grade histologique SBR

Le grade de Scarff-Bloom et Richardson (**SBR**) est basé sur des caractéristiques des cellules tumorales (taille et forme des noyaux, nombre de mitoses) ainsi que sur l'architecture de la tumeur (présence de tubes ou non). Chaque critère est évalué sous forme de score de 1 à 3, dont la somme permet de déterminer le grade : grade **SBR I** (score de 3 à 5), grade **SBR II** (score de 6 à 7) et grade **SBR III** (score de 8 à 9).

La classification moléculaire

Les cancers du sein peuvent être classés selon 4 paramètres moléculaires : 1) l'amplification de l'oncogène **Her2**, l'expression des **récepteurs hormonaux** aux œstrogènes (**ER**) et à la progestérone (**PR**), 3) le marqueur de **prolifération Ki67** et 4) les protéines d'**adhésion cellulaire**. Cette classification permet de définir les sous-types suivants : **Luminal A et B**, **Her2-amplifié**, **Basal-like** et **Claudin-low**. Les tumeurs de type **Basal-like** et **Claudin-low** sont regroupées sous le nom de tumeurs « **Triple-négative** ».

Prise en charge thérapeutique

Le traitement principal des cancers du sein est la **chirurgie**. Pour les cancers *in situ*, elle est suivie ou non d'un traitement par **radiothérapie**. Pour les autres cancers, la chirurgie est suivie d'un traitement complémentaire. Les cancers de type *Her2*-amplifié peuvent bénéficier de **thérapies ciblant la protéine Her2** (anticorps monoclonal Trastuzumab ou molécule chimique Lapatinib). Les patientes porteuses de tumeurs exprimant

les récepteurs hormonaux reçoivent des **hormonothérapies** (Tamoxifen, anti-aromatases). Les tumeurs de type Triple-négatives sont traitées par **chimiothérapies** conventionnelles (Doxorubicine, taxanes, Cyclophosphamide 5-fluoro-uracile).

Impact pronostique des différents sous-types de cancer du sein

Les cancers *in situ* sont de meilleur pronostic que les cancers infiltrants avec une survie sur une période de 10 ans supérieure à 95%. Les tumeurs de sous-type Luminal A sont de meilleur pronostic tandis que les tumeurs Triple-négatives (basal-like et claudin low) ont le pronostic le plus défavorable.

Sous-type	Récepteurs hormonaux	Her2	Ki67	Molécules d'adhésion
Luminal A	++	-	Faible	Non discriminant
Luminal B	+	+/-	Fort	Non discriminant
Her2-amplifié	-	+	Non discriminant	Non discriminant
Basal-like	-	-	Non discriminant	+
Claudin-low	-	-	Non discriminant	-

Résultats

IL-33 drives polyfunctionality of a unique ST2⁺ NK cell population with anti-tumor function

Anaïs Eberhardt¹, Elena Blanc¹, Valentin Picant¹, Margaux Hubert¹, Fanny Onodi¹, Vincent Alcazer¹, Yamila Rocca¹, Aurélien Voissière¹, Céline Rodriguez¹, Benjamin Estavoyer¹, Emilie Charrier⁴, Olivier Tredan², Isabelle Treilleux², Philippe Krebs³, Antoine Marçais⁴, Thierry Walzer⁴, Christophe Caux^{1*}, Nathalie Bendriss-Vermare^{1*#}

¹ Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, INSERM U1052, CNRS UMR5286, Université de Lyon, Université Lyon 1, Centre Léon Bérard, F-69000 Lyon, France.

² Department of Medical Oncology, Centre Léon Bérard, F-69000 Lyon, France.

³ Institute of Pathology, University of Bern, Bern, Switzerland.

⁴ CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie Lyon, France; INSERM, U1111, Lyon, France; École Normale Supérieure de Lyon, Lyon, France; Université Lyon 1, Lyon, France; and CNRS, UMR 5308, Lyon, France.

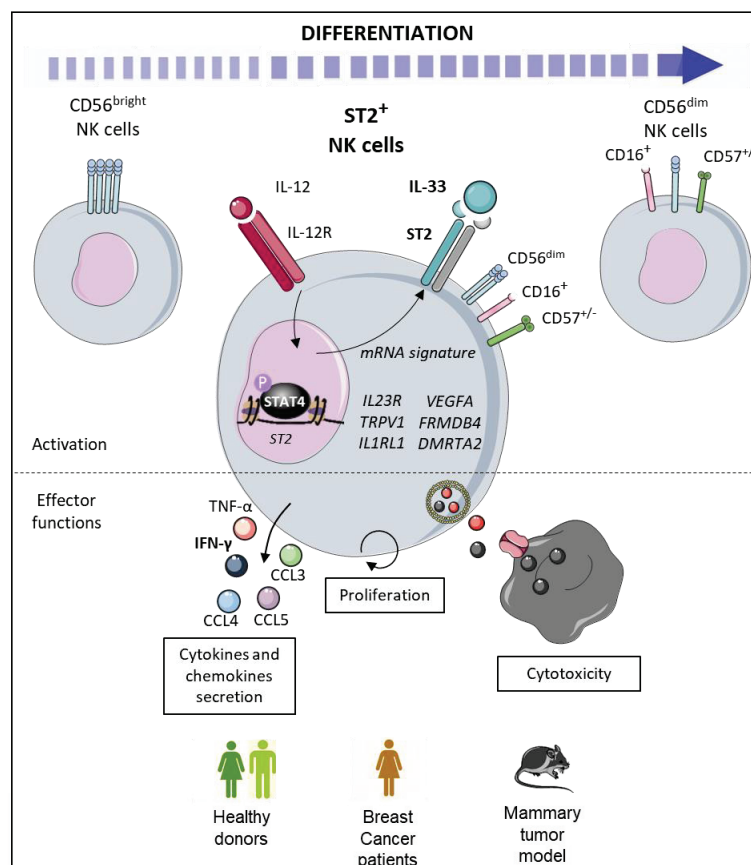
*These authors contributed equally to this work

#Corresponding author. Email: nathalie.bendriss-vermare@lyon.unicancer.fr

Highlights

- IL-33 is a strong activator of human and mouse NK cells in blood and tumors
- ST2 expression on NK cells depends on IL-12/STAT-4 axis
- ST2⁺ NK cells represent a unique highly polyfunctional subset
- *IL33* correlates with increased survival in cancer patients
- IL-33 synergizes with IL-12 to promote anti-tumor immune response *in vivo*

Key words: NK cells, IL-33, ST2/IL1RL1, IFN- γ , RNAseq



Abstract

Natural Killer (NK) cells have evolved into a spectrum of effector subsets which differ in terms of functions, location, and responsiveness to activating stimuli to ensure complementary roles in the immune response. Cytokines are essential for the regulation of NK cells differentiation and activation. Here, we showed that IL-33, an IL-1 family member, when combined with IL-12, strongly activated a subset of human blood ST2⁺ NK cells' sharing phenotypic features with CD56^{dim} NK cells but endowed with functions from both CD56^{bright} (IFN- γ production) and CD56^{dim} NK cells (cytotoxicity). Transcriptomic analysis revealed a distinct and unique transcriptional program of ST2⁺ NK cells which defines them as an intermediate differentiation state between canonical CD56^{bright} and CD56^{dim} NK cells. Furthermore, *IL33* and *ST2* expression is downregulated in human tumors compared to normal adjacent tissues and is associated with increased overall patient survival in several cancers. Unexpectedly, peripheral and tumor-infiltrating NK cells isolated from breast cancer patients retain their ability to produce IFN- γ in response to IL-33 and IL-12. Consistently, combination of IL-33 with IL-12 strongly reduced tumor development, improved survival, and induced IFN- γ production, through NK cells, in an orthotopic mammary tumor mouse model. Thus, our work reveals IL-33 as a novel activator of a unique and highly polyfunctional intermediate NK cell population, with promising features for the development of new immunotherapy strategies.

Introduction

Natural Killer (NK) cells are innate lymphocytes involved in host defense against viral infections and tumors (Cerwenka and Lanier, 2001) via their cytolytic function and Interferon-gamma (IFN- γ) production (Vivier et al., 2008; Robertson, 2002). Human NK cells are classically divided into two major subsets, namely CD56^{bright} and CD56^{dim}, showing profound phenotypical and functional differences (Cooper et al., 2001a; Campbell et al., 2001; Freud et al., 2017). CD56^{bright} NK cells, predominant in lymphoid tissues, are more efficient in the production of cytokines and chemokines, including IFN- γ , Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α), CCL3/4 (Macrophage Inflammatory Protein 1 α/β) or CCL5 (RANTES), and retain higher proliferative abilities compared to CD56^{dim} NK cells (Cooper et al., 2001b; Fehniger et al., 2003; Michel et al., 2016; Caligiuri et al., 1990). In contrast, CD56^{dim} NK cells represent 90% of circulating NK cells and show higher cytotoxic abilities but reduced proliferation compared to CD56^{bright} NK cells (Freud et al., 2017). Moreover, CD56^{dim} NK cells express the activating Fc- γ receptor III (CD16), endowing them with the capacity for antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC), and are thus instrumental in the humoral response following antibody-based antitumor therapies (Kohrt et al., 2012; Lo Nigro et al., 2019). Although developmental relationships between NK cell subsets remain partially unsolved, it seems that CD56^{dim} NK cells would originate from the differentiation of CD56^{bright} NK cells (Romagnani et al., 2007; Huntington et al., 2009). Recent evidence unraveled that CD56^{dim} NK cells can acquire differentiation, activation, and adaptive markers to give rise to a panel of phenotypically and functionally distinct subsets including terminally differentiated, memory-like, adaptive or hyporesponsive exhausted-like NK cells in some contexts (Björkström et al., 2010; Lopez-Vergès et al., 2010; Yu et al., 2010; Sun et al., 2009; Judge et al., 2020). These NK cell subsets are characterized by profound changes in transcriptional programs regulated by dramatic epigenetic modifications and chromatin re-arrangements, highlighting similarities with effector T cells differentiation programs (Hanna et al., 2004; Crinier et al., 2018; Lau et al., 2018; Collins et al., 2019; Bezman et al., 2012). Therefore, NK cell diversity is much wider than originally depicted and delineates subsets with functional differences of particular interest to understand viral or tumor clearance and develop new therapeutic strategies (Wang et al., 2015; Berrien-Elliott et al., 2015; Fehniger and Cooper,

2016). In this context, NK cells developmental programs orchestrating this diversity are presently under vivid interest.

Cytokines strongly participate in NK cell activation and specific NK cell functions can be preferentially driven by distinct cytokines. Interleukin-12 (IL-12) is critical to drive NK cell cytokine production and specifically a canonical IFN- γ response (Kobayashi et al., 1989). Other type 1 cytokines, including IL-15 (Carson et al., 1994) and IL-18 (Lauwerys et al., 1999; Chaix et al., 2008), synergize with IL-12 to increase NK cell cytotoxicity and IFN- γ production respectively. Interleukin-33 (IL-33), one of the newest members of the IL-1s cytokine family, is described as a multiple function cytokine (Schmitz et al., 2005; Garlanda et al., 2013). Constitutively trapped in the nucleus of non-immune cells at tissue barriers, IL-33 can be released in response to cellular stress and damage to act as an alarmin by binding to its ST2/IL1RL1 receptor (Cayrol and Girard, 2018). IL-33/ST2 axis was initially identified as a positive regulator of type-2 immune responses, through the activation of type-2 helper T cells, mast cells, basophils, eosinophils, and type-2 Innate Lymphoid cells (ILC2) which constitutively express ST2 (Hardman and Ogg, 2016). Consistently, IL-33 plays a key role in type-2 immune disorders such as allergy or parasitic infections (Liew et al., 2016). However, more recent studies reported that IL-33 can activate type-1 helper T cells (Th1), CD8⁺ T cells but also NK and NKT cells associated with viral and tumor clearance in contexts enriched for type-1 cytokines (Smithgall et al., 2008; Yang et al., 2011; Bonilla et al., 2012; Baumann et al., 2015; Fournié and Poupot, 2018). Subsequent studies also reported ST2 expression on a subset of tissue-resident regulatory T cells (Tregs) involved in immune suppression and tissue repair (Schiering et al., 2014; Matta et al., 2014; Pastille et al., 2019; Molofsky et al., 2015). Thus, IL-33 is a pleiotropic cytokine regulating diverse immune responses.

Theoretically, NK cells are highly potent in tumor elimination as they can directly eliminate primary and metastatic cancer cells but also support effective innate and adaptive anti-tumor immune responses (Chiossone et al., 2018). Consistently, they are associated with good prognosis in many cancers (Rusakiewicz et al., 2013; Denkert et al., 2018; Barry et al., 2018; Cursons et al., 2019). However, NK cells infiltrating advanced tumors show impaired effector functions (Dahlberg et al., 2015; Verronè et al., 2016; Liu et al., 2019). Understanding mechanisms suppressing NK cells' activity in the tumor microenvironment and identifying new candidates for NK cell activation is thus of great interest to develop new therapeutic strategies (Shimasaki et al., 2020). The role of IL-33 in tumor development is controversial, with both pro and antitumor effects reported (Fournié and Poupot, 2018). Interestingly, previous works have shown that IL-33 restrains tumor development in mouse models by favoring CD8⁺ T cell and NK cell recruitment and activation (Gao et al., 2013, 2015; Eissmann et al., 2018; Qi et al., 2020).

In this study, we evaluated the potential of IL-33 as a novel activator of human NK cells, in physiological and pathological context of breast cancer (BC). We unraveled the pathway for NK cell activation by IL-33, where IL-12 up-regulates ST2 expression on a subset of NK cells in a STAT-4-dependent manner. Following IL-33 stimulation, ST2⁺ NK cells showed increased secretory and cytotoxic functions, and exhibited higher proliferative ability. RNA-seq analysis identifies ST2⁺ NK cells as an intermediate population between canonical CD56^{bright} NK cells and CD56^{dim} NK cells. Analysis of BC patients' samples and public transcriptomic databases highlighted that IL-33 is expressed in the tumor microenvironment and correlates with good prognosis in several cancer types. Accordingly, we identified IL-33-responsive NK cells in the blood and tumor samples from BC patients, which maintain functional IFN- γ production. Consistently, combination of IL-33 with IL-12 efficiently reduces tumor growth in mammary mouse tumor model, concomitantly with high IFN- γ production, both in a NK cell-dependent manner. Therefore, ST2⁺ NK cells represent an unprecedentedly characterized polyfunctional NK cell subset with relevant clinical features for anti-cancer NK cell-based therapies.

IL-33 synergizes with IL-12 to activate human NK cell secretory and cytotoxic functions

Given the recently established role of IL-33 in type-1 immune responses (Bonilla et al., 2012; Baumann et al., 2015), we examined human peripheral blood NK cell activation in response to IL-33 and other IL-1s family members, in comparison with canonical NK cell activating signals such as cytokines (*i.e.* IL-12, IL-2, IL-15 or IFN- α), agonistic antibodies against NKp30 and NKp46 activating receptors (NKaR) or MHC-I-deficient K562 target cells. First, the production of IFN- γ by NK cells was barely detectable after stimulation with IL-33, IL-1 α , IL-1 β or IFN- α alone in contrast to IL-18, IL-12, IL-15 or IL-2 alone (from 35 to 260 pg/mL) (Figure 1A). However, when combined with IL-12, IL-33 remarkably enhanced IFN- γ secretion by NK cells (750-fold, from 75,000 to 380,000 pg/mL) being the second most potent inducer of IFN- γ secretion by NK cells after IL-18 and IL-12 combination (250,000 to 950,000 pg/ml, Figures 1A and S1A-D). IL-33 also induced 4-fold more IFN- γ than IL-1 α and IL-1 β , when combined with IL-12 (Figure 1A). IL-33 and IL-12 cooperation was dose-dependent and could be detected within a few hours to reach an optimum at 72hrs (Figure S1E). Of note, this synergistic effect was slightly slower than the one observed for IL-18 and IL-12 combination but from 72hrs the two combinations eventually led to comparable extremely high IFN- γ levels (>1 μ g/ml, Figure S1E). At lower doses (1 ng/ml), IL-33 induced even higher levels of IFN- γ than the canonical activator IL-18, when combined with IL-12 (Figure S1A). IL-33 also synergizes with IL-2 (60-fold), IL-15 (7-fold) but not with anti-NKaR agonistic antibodies or K562 target cells (Figure 1A and S1A-D). Furthermore, IL-33 and IL-12 combination was the second most potent signal, following IL-18 and IL-12 combination, to induce NK cells cytotoxicity towards K562 target cells (Figures 1B and S1F) and to induce CD25 and CD69 activation markers expression on NK cells (Figure 1C). Taken together these results indicate that, like IL-18, IL-33 is a potent activator of both secretory and cytotoxic activities of human NK cells when combined with IL-12.

IL-12 induces ST2 expression on a subset of human NK cells in a STAT-4 dependent manner

To determine the role of IL-33 receptor, ST2, in NK cell activation, we performed blocking experiments using specific antagonistic molecules against IL-1 family cytokines and receptors. Blockade of the IL-33 receptor ST2, and not of any other IL-1 family cytokines or receptors, abrogated IL-33 and IL-12 synergistic effect on IFN- γ production (Figures 2A and S2A). In addition, ST2 blockade had no effect on IFN- γ induced by other IL-1 family members combined with IL-12 (Figure S2A). To better understand the synergy between IL-12 and IL-33, we analyzed the regulation of ST2 expression in NK cells upon IL-12 stimulation. ST2 mRNA expression was very low in resting NK cells but was increased up to 15- or 35-fold upon IL-12 or IL-12 and IL-33 stimulation respectively (Figure 2B), in a time-dependent manner to reach an optimal level after 48hrs (Figure S2B). On the contrary, *IL1RAcP* accessory chain mRNA expression was not modulated upon stimulation (Figures 2B and S2B). Consistently, we did not detect any ST2 protein expression on the surface of resting NK cells but we demonstrated for the first time detectable levels of ST2 induced on the surface of 20% to 28.5% of total NK cells upon IL-12 stimulation (Figures 2C and 3A). This result is consistent with the delayed secretion of IFN- γ observed in response to IL-33 and IL-12 combination (Figure S1E) compared to IL-18 and IL-12 combination as IL18R is constitutively expressed on NK cells (Figure 3A). As IL-12 mainly activates STAT-4 transcription factor to induce a set of target genes (Trinchieri, 2003), we treated NK cells with a specific inhibitor of STAT-4 phosphorylation, lisofylline, and observed a dramatic decrease of ST2 expression alongside with the decrease in STAT-4 phosphorylation upon IL-12 treatment (Figures 2C and S2C). We also performed *in silico* analysis of predicted STAT-4 binding sites and identified several potential sites in ST2 promoter and gene (data not shown). We then confirmed STAT-4 selective enrichment in ST2 promoter by performing Chromatin Immuno-Precipitation (ChIP)-qPCR in primary NK cells stimulated with IL-12

(Figure S2D). We therefore demonstrated that IL-12 stimulation positively regulates ST2 mRNA and protein surface expression in a subset of NK cells through direct binding of STAT-4 in ST2 promoter.

IL-33 preferentially activates human CD56^{dim} NK cells

IL-12 treatment induced ST2 expression only in a subset of human NK cells exhibiting intermediate levels of CD56 surface expression (Figure 2C). Consistently, FACS-sorted CD56^{bright} and CD56^{dim} NK cell subsets did not express ST2 at steady state but IL-12 triggered ST2 expression selectively on a subset of CD56^{dim} NK cells (15 to 28.5%, Figure 3A). Using NF- κ B (p65), MAPkinases (p38), and mTOR (S6) signaling pathways activation as hallmarks for IL-33 activity, we observed that following IL-12 stimulation for 24hrs, IL-33 stimulated p65, p38, and S6 phosphorylation in a subset of CD56^{dim} NK cells (20.9% to 33.3%, Figures 3B and S3A). Interestingly, selective activation of CD56^{dim} NK cells was specific to IL-33, when compared to other IL-1 family members. Indeed, CD56^{bright} NK cells constitutively expressed low but significant levels of IL-1R1 and phosphorylated p65, p38, and S6 in response to IL-1 α and IL-1 β alone and at higher levels following IL-12 stimulation (Figures 3A-B and S3A). In contrast, both CD56^{bright} and CD56^{dim} NK cells constitutively expressed high levels of IL-18R1 hence responded to IL-18 alone and at higher levels following IL-12 stimulation (Figures 3A and S3A). Consistently, IL-12 and IL-33 combination activated a greater proportion of CD56^{dim} than CD56^{bright} NK cells as evidenced by IFN- γ ⁺ CD25⁺ (25% versus 5%) (Figure 3C) and IFN- γ ⁺ CD69⁺ (28% versus 5%) (Figure S3B) double positive NK cells. Furthermore, preactivation with IL-12 and IL-33 combination was the most potent signal to stimulate CD56^{dim} NK cell proliferation in response to IL-2 but had almost no effect on CD56^{bright} NK cell proliferation (Figure 3D). In contrast, IL-1 α and IL-1 β preferentially activated CD56^{bright} NK cells to produce IFN- γ , upregulate CD25 and CD69, and proliferate in response to IL-2; whereas IL-18 activated both subsets (Figures 3C, 3D, and S3B). When comparing secretory profiles for CD56^{bright} and CD56^{dim} NK cells, we detected none (GM-CSF) to low (CCL3, CCL4, CCL5 and IFN- γ) cytokine production by CD56^{bright} NK cells after stimulation with IL-12 and IL-33 (Figure 3E). Conversely, CD56^{dim} NK cells produced detectable to very high levels of cytokines and chemokines such as IFN- γ (17,627pg/mL +/- 4,488), TNF- α (276pg/mL +/- 169), CCL3 (482pg/mL +/- 120), CCL4 (2,300pg/mL +/- 425), CCL5 (309pg/mL +/- 34), IL-8 (35pg/mL +/- 31), and IL-6 (17pg/mL +/- 21) in the same activation settings. Interestingly, compared to other IL-1 family cytokines, IL-33 was the most potent inducer of TNF- α , CCL3, and CCL4 production and unique to induce an inflammatory secretome by CD56^{dim} NK cells as evidenced by the concomitant and high production of inflammatory cytokines and chemoattractants (Figure 3E). Of note, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-17A, IL-22 or G-CSF were not produced by neither of the two subsets in response to IL-1 family members and IL-12. Collectively, these results unequivocally indicate that IL-33 preferentially activates a subset of CD56^{dim} NK cells and highlight differences in the regulation of NK cell' activation by IL-1s family cytokines. Considering CD56^{dim} NK cells' heterogeneity based on surface expression of CD57 and KIRs (*i.e.* KIR3DL1, KIR2DL1, KIR2DS1/S3/S5) (Lopez-Vergès et al., 2010; Björkström et al., 2010), while IL-18 induced the highest level of IFN- γ in CD56^{bright}, IL-33 induced the highest level of IFN- γ in the intermediate CD57⁻ KIR⁻ CD56^{dim} NK cells (Figure 3F). Then, IFN- γ production gradually decreased with the acquisition of KIRs and CD57 expression in response to both IL-33 and IL-18. In line with this observation, ST2 expression was significantly increased in CD57⁻ compared to CD57⁺ CD56^{dim} NK cells (Figure 3G). These results indicate that ST2 expression is restricted to CD56^{dim} NK cells although not strictly associated with CD57 expression, while CD56^{dim} NK cell' ability to produce IFN- γ in response to IL-33 is lost in terminally-differentiated CD57⁺ KIR⁺ CD56^{dim} NK cells.

ST2⁺ NK cells show a unique and intermediate transcriptional signature between conventional CD56^{bright} and CD56^{dim} NK cells

To further characterize human ST2⁺ NK cells, we performed RNA-seq analysis on eight FACS-sorted NK cell subsets based on their surface expression of CD56, CD57, and ST2 following 24h culture in medium or IL-12 to induce ST2 expression (Figure 4A). Principle Component Analysis (PCA) revealed a segregation of ST2⁺ NK cells from CD56^{bright} and CD56^{dim} ST2⁻ NK cells (PC1 axis, 39% variance) and a segregation of samples stimulated with medium versus IL-12 (PC2 axis, 27% variance) (Figure 4B). These results confirmed that ST2 expression identifies a specific NK cell subset distinct from CD56^{bright} and CD56^{dim} NK cells compartments. Indeed, we identified 234 genes specifically upregulated in ST2⁺ NK cells versus CD56^{bright} and CD56^{dim} NK cells stimulated with IL-12, among which some were associated with NK cell maturation, effector functions or proliferation; encoding surface proteins (e.g., *IL23R*, *IL1RL1*, *TRPV1*, *SLC16A1*, *ITGA3*, *MT1X*, *PTGER3*, *ULBP1*, *ICAM1*, *HPSE*, *TREML2*, *LRP8*, *EDA2R*), secreted proteins (*VEGFA*, *GZMA*, *IFNG*), or transcription factors (TFs) (*DMRTA2*, *E2F2*, *E2F1*, *EZH2*, *ATF3*), hence defining ST2⁺ NK cell signature (Figures 4C, 4D and S4). Besides specific genes, ST2⁺ NK cells also shared sets of genes with CD56^{bright} or CD56^{dim} NK cells (Figure 4E), highlighting their intermediate state. As for example, we identified genes expressed at intermediate levels and shared either with CD56^{bright} NK cells encoding secreted molecules (*TNF*, *XCL1*, *XCL2*, *GZMK*); chemokine receptors (*CCR1*, *CCR5*, *CCR6*) or cytokine receptors (*IL2RA*, *IL2RB*, *IL12RB2*) or with CD56^{dim} NK cells encoding differentiation markers (*FCGR3A*, *KIR2DL1*, *KIR2DL3*, *KIR3DL1*, *KIR3DL2*); chemotactic receptors (*CXCR1*, *CXCR2*, *CX3CR1*, *S1PR5*); inflammatory chemokines (*CCL3*, *CCL4*, and *CCL5*) or cytotoxicity (*GZMH*) (Figure 4F). Interestingly, TFs defining CD56^{bright} NK cell regulatory program were absent in ST2⁺ NK cells (e.g., *BACH2*, *LEF1*, *TCF7*) whereas TFs specifically regulating CD56^{dim} NK cell program (e.g., *MAF*, *NFIL3*, *PRDM1*, *TBX21*, *ZBTB16*, *ZEB2*) were all expressed in ST2⁺ NK cells and systematically (except for *NFIL3*) showing intermediate levels of expression compared to CD56^{dim} NK cells (Figures 4E and 4F). Altogether, these results confirm that ST2⁺ NK cells belong to CD56^{dim} NK cells compartment but might represent a transitory differentiation state between canonical CD56^{bright} and CD56^{dim} NK cells and sharing transcriptional features with both subsets. Previous study highlighted a continuum in NK cell differentiation path, with CD57⁺ CD56^{dim} NK cells representing a terminally differentiated state (Collins et al., 2019). Consistently, CD57⁻ ST2⁺ NK cells showed higher expression for genes in common with CD56^{bright} NK cells (*LEF1*, *XCL1*, *TNF*, *GZMK*), whereas CD57⁺ ST2⁺ NK cells showed higher expression for genes in common with CD56^{dim} NK cells (*FCGR3A*, *CX3CR1*, *KIR2DL1*, *KIR2DL3*, *KIR3DL1*, *KIR3DL2*, *NFIL3*, *PRDM1*, *ZEB2*, *GZMH*) (Figures 4E and 4F). We then evaluated the enrichment score for CD56^{bright}, CD56^{dim}, and ST2⁺ NK cell signatures in each subset respectively by single sample gene set enrichment analysis (ssGSEA). Similarly, ST2⁺ NK cells showed an intermediate enrichment score for both CD56^{bright} and CD56^{dim} NK cells' signature, with CD57⁻ ST2⁺ NK cells showing a higher enrichment for CD56^{bright} NK cells' signature whereas CD57⁺ ST2⁺ NK cells showed a higher enrichment for CD56^{dim} NK cells' signature (Figure 4G). Altogether, gene expression patterns in ST2⁺ NK cells highlighted a transitory state within NK cell differentiation characterized by an intermediate phenotype and polyfunctional effector functions. Strikingly, *IL12RB2* expression (encoding IL-12Rβ2) was gradually decreased from CD56^{bright} to CD57⁺ CD56^{dim} NK cells with intermediate expression in ST2⁺ NK cells whereas *IL12RB1* (encoding IL-12Rβ1) showed limited variation in all subsets analyzed (Figures 4D and S4C), suggesting that downregulation of IL-12Rβ2 in CD56^{dim} NK cells accounts for their inability to respond to IL-12 and express ST2.

IL-33 is expressed in human breast tumors and is associated with better survival

We investigated the expression of IL-33 and other IL-1 family cytokines as well as their receptors in human cancers using gene expression data from the Cancer Genome Atlas (TCGA). We detected *IL33* mRNA expression in virtually all cancers although *IL33* level was significantly lower in tumoral compared to adjacent normal tissue in half of cancers (7/14; Figure 5A). In contrast, *IL18*, *IL1A*, and *IL1B* gene

expression was significantly higher in several cancers (6/14, 2/14 and 6/14 respectively; [Figure S5A](#)). These results highlight a specificity for IL-33 expression among IL-1s cytokines in cancer and suggest that IL-33 downregulation is linked to tumor progression, including in the context of BC. As *IL33*, *ST2* was downregulated in cancers (9/14) compared to adjacent normal tissues, with some cancers showing very low levels if any of *ST2* ([Figure 5A](#)). *IL18R1* and *IL1R1* expression patterns were quite similar and are characterized by a lower expression in 4/14 and 5/14 cancers respectively and a higher expression in pancreatic cancer (PAAD) compared to adjacent normal tissue ([Figure S5A](#)). When analyzing TCGA datasets for breast invasive carcinoma (BRCA, n = 940), we observed higher *IL33* expression in normal-like, followed by luminal A, then triple-negative, ER⁺, basal-like, and *Her2*-amplified tumors showing similar levels, and the lowest levels were found in luminal B subtype ([Figure 5B](#)). We confirmed the presence of IL-33 protein in 95% of tumor milieu generated following breast tumors mechanical disruption, with a concentration ranging from 10 to 1483pg/mL (n=84; [Figure 5C](#)). Highest levels were detected in luminal tumors compared to Her2⁺ and triple negative tumors, consistent with our TCGA analysis. We then analyzed IL-33 expression *in situ* by immunohistochemistry (IHC) using Tissue Micro Arrays (TMA) from breast tumors. As previously reported ([Moussion et al., 2008](#)), we detected strong nuclear IL-33 staining in endothelial cells forming blood vessels in breast tumors ([Figure 5D](#)). IL-33 was also found in isolated stromal cells with either round or fibroblastic morphology in areas surrounding the tumor, which could be immune cells, cancer-associated fibroblasts (CAFs) or Fibroblastic Reticular Cells (FRCs) supporting ectopic lymphoid structures when found in highly infiltrated areas ([Figure 5D](#)). We did not observe any nuclear IL-33 expression in tumor cells while myoepithelial cells from normal acini showed some positive nuclear IL-33 staining ([Figure 5D](#)). We also took advantage of public transcriptomic dataset comparing gene expression in microdissected stromal versus epithelial areas from non-invasive DCIS and IBC ([Lee et al., 2012](#), GSE41228). We confirmed that *IL33* mRNA expression was mainly restricted to the stroma, and enriched in early non-invasive lesions (DCIS) compared to advanced invasive breast tumors (IBC) ([Figure 5E](#)), consistent with a loss of IL-33 expression in cancer cells during breast cancer tumorigenesis. We then explored *IL33* prognostic impact in TCGA data set compared to other IL-1 family cytokines. In breast cancer, *IL33* expression was significantly associated with an increase in Overall Survival (OS) (p-value = 0.0011), while *IL18*, *IL1A*, and *IL1B* had no impact ([Figures 5F and S5B](#)). We extended our analysis to other human cancers and revealed that *IL33* was the only IL-1s family cytokine more frequently associated with an improved OS (in 4 cancer types: breast carcinoma, p= 0.0011; hepatocellular carcinoma, p= 0.0023; lung carcinoma, p= 0.038; metastatic melanoma, p< 0.0001), with the exception of bladder cancer where *IL33* is associated with a decreased OS but with lower significance (p = 0.048) ([Figures 5F and S5B](#)). Importantly, multivariate analysis in BC patients highlighted that *IL33* remained a marker for progression-free survival regardless of the molecular subtype, the stage of the disease, and patients' age ([Figure 5G](#)). We observed a similar trend regarding *ST2* expression, which was associated with a better survival in three cancer types (p-values: kidney carcinoma = 0.017; hepatocellular carcinoma = 0.0096; metastatic melanoma = 0.047), again with the exception of bladder cancer (p-value = 0.035) ([Figures 5F and S5B](#)). In contrast, *IL18*, *IL1A*, *IL1B*, and *IL1R1* were rather associated with a negative impact in several cancers. Of note, *IL18R1* was associated with a good prognosis in breast cancer (p-value = 0.027) and skin cutaneous melanoma (p-value = 0.012) ([Figures 5G and S5B](#)). Altogether, these results reveal a strong positive association between IL-33/*ST2* axis and patients' survival in multiple cancer types in contrast to other members of IL-1s cytokine family.

Tumor-infiltrating NK cells show anti-tumor abilities in response to IL-33

IHC analysis revealed IL-33⁺ cells in the vicinity of immune cells infiltrating peritumoral stroma. We thus wondered if endogenous IL-33 could activate tumor-infiltrating NK cells. By analyzing fresh BC

infiltrates by flow cytometry, we were able to detect NK cells in 85% of breast tumors (40/46), representing up to 7% of total infiltrating immune cells, regardless of BC molecular subtypes (Figures 6A and 56). We then monitored p65 phosphorylation as a reporter for IL-33-responsiveness in blood and tumor-infiltrating NK cells from BC patients compared with NK cells isolated from healthy donors' blood. We performed paired analysis on tumor and blood samples when both were available for the same patients (colored dots). As in healthy donors' NK cells, IL-33 alone did not induce p65 phosphorylation (Figure 6B). However, when combined with IL-12, we detected p65 phosphorylation in a subset of peripheral and tumor-infiltrating NK cells from BC patients (26.2% +/- 15.9% and 16.6% +/- 4.3% respectively). Interestingly, the proportion of p-p65 NK cells in BC patients' blood was similar to healthy donors (26.2% +/- 15.9% and 29.4% +/- 9.6% respectively), although we tend to observe a greater variability in BC patients. For tumor-infiltrating NK cells, the proportion of p-p65 NK cells was slightly lower compared to patients' blood NK cells, although not statistically significant (16.6% +/- 4.3% and 26.2% +/- 15.9% respectively). Of importance, we did not detect any p65 phosphorylation in both peripheral and tumor-infiltrating CD3⁺ T cells (Figure 6B), suggesting specific action of IL-33 on NK cells. We then analyzed IFN- γ production in response to IL-33 and IL-12 combination and observed similar results as we detected IFN- γ in a subset of peripheral and tumor-infiltrating NK cells from BC patients (22.4% +/- 12.6% and 9.9% +/- 3.7% respectively) with a trend towards lower production in tumor-infiltrating NK cells (Figure 6C). Taken together, these results indicate that within tumor microenvironment NK cells retain the ability to respond to IL-33 stimulation by activating inflammatory signaling pathways responsible for IFN- γ production and suggest a potential anti-tumor effect of exogenous IL-33.

Combination of IL-33 with IL-12 promotes NK cell' antitumor activity *in vivo*

Given the potential for IL-33 to drive peripheral and tumor-infiltrating NK cells activation *ex vivo*, we wondered if IL-33 could mount an efficient anti-tumor immune response mediated by NK cells *in vivo* in a mouse model. As for human NK cells, IL-12 is required to upregulate ST2 expression on the surface of a subset of mouse spleen NK cells (Figure S7A) which in turns became responsive to IL-33 and produced IFN- γ in response to IL-33 and IL-12 combination (Figure S7B). Expression patterns for IL18R1 and IL1R1 receptors and IFN- γ production following IL-18 or IL-1 α and IL-1 β stimulation were also similar to human blood NK cells. We then used E0771 breast cancer primary tumor model known to be controlled by NK cells (Tu et al., 2017) to evaluate the potential of IL-33 and IL-12 combination to control primary tumor development. Mice were orthotopically injected in the mammary gland with E0771 tumor cells and then treated with IL-33 and IL-12 alone or in combination injected twice a week in peritumoral region (Figure 7A). IL-33 and IL-12 co-injections dramatically reduced primary tumor growth in comparison to NaCl-treated control group (Figure 7A). Of note, we also observed a trend toward reduced tumor growth when mice were treated with IL-12 or IL-33 alone although to a lesser extent and not statistically significant compared to their combination (Figure 7A). Consistently, IL-33 and IL-12 combination significantly increased long-term survival of treated mice in comparison to mice treated with NaCl or IL-12 alone or IL-33 alone (Figure 7B). Importantly, we detected systemic IFN- γ production only in the serum of mice treated with IL-33 and IL-12 combination (Figure 7C). Strikingly, tumor growth inhibitory activity, prolonged survival, and IFN- γ production associated with IL-33 and IL-12 combination were lost when NK cells were depleted using anti-NK1.1 antibody (Figures 7D, 7E, and 7F). Similarly, primary tumor growth was also greatly reduced in T and B cell-deficient *Rag2*-KO mice treated with IL-33 and IL-12 combination, in an NK cell-dependent manner (Figure S8A). As for immunocompetent mice, *Rag2*-KO mice survival (Figure S8B) and IFN- γ production in serum (Figure S8C) in response to IL-33 and IL-12, were reduced when NK cells were depleted. Altogether these results demonstrate that IL-33 and IL-12 show inhibitory activity on primary tumor development that is dependent on NK cells and associated with IFN- γ production.

While the role of IL-33 in the regulation of type-2 immune responses is well established, its role in type-1 immune responses and more precisely on NK cells' activation remained elusive and poorly characterized. Results presented here demonstrate that IL-12 induces ST2 expression on a specific subset of CD56^{dim} NK cells. ST2⁺ NK cells hence become responsive to IL-33, which potentiate their proliferation in response to IL-2 and activate both their secretory and cytotoxic functions. Phenotypic, functional, and transcriptional profiling of ST2⁺ NK cells identify a unique subset distinct from less mature secretory CD56^{bright} and more differentiated cytotoxic CD56^{dim} NK cells, endowed with phenotypic and functional features of both populations. This ST2⁺ NK polyfunctional subpopulation is relevant in the context of antitumor immunity as we detected IL-33 expression in human breast tumors associated with good prognosis, and NK cells isolated from patients' blood and tumors remain responsive to IL-33 and IL-12 combination. Accordingly, IL-33 and IL-12 combination significantly delays E0771 mammary tumor growth, increases mouse survival, and induces IFN- γ secretion, in an NK-cell-dependent manner. These findings uncover an important role for IL-33 in antitumor immunity via NK cell activation that could be exploited as novel cancer immunotherapies.

Our work shows that IL-33, a member of the IL-1s cytokines family mainly associated with type-2 immunity, synergizes with IL-12 for IFN- γ production by NK cells, consistent with previous reports (Smithgall et al., 2008; Ochayon et al., 2020). The type-1 cytokine, IL-18, similarly synergizes with IL-12 to activate NK cells (Nakahira et al., 2002). The potency of IL-33 synergy with IL-12 was far superior over the two other IL-1 family cytokines, IL-1 α and IL-1 β and identical to that of IL-18 after 72hrs, when ST2 expression on NK cells reached optimal levels; and was even stronger at lower doses of cytokines.

A first mechanism explaining the synergy between IL-12 and IL-33 for IFN- γ secretion lies in the positive regulation of ST2 expression by IL-12. Indeed, we observed that IL-12 upregulates ST2 expression in human NK cells, in agreement with previous works (Smithgall et al., 2008). We also show for the first time ST2 expression at the protein level on human CD56^{dim} NK cells after IL-12 stimulation. Mechanistically, we report that IL-12 induces and stabilizes ST2 expression on CD56^{dim} NK cells through a direct binding of STAT-4 in ST2 promoter, corroborating previous report in mouse Th1 cells (Baumann et al., 2015). In IL-12 and IL-18 synergy, STAT4, activated by IL-12 (Thierfelder et al., 1996), forms a stable complex with c-jun, activated by IL-18, and this STAT4-c-jun complex binds with high affinity to IFN- γ promoter hence responsible for tremendous IFN- γ secretion by NK cells (Nakahira et al., 2002). IL-18 also activates p38-MAPK pathway, which stabilizes newly synthesized *IFNG* transcripts. IL-33 also activates c-jun (Fang et al., 2017). It was recently shown that p38-MAPK activation downstream IL-33 also enhanced stability of *IFNG* transcripts in human NK cells (Ochayon et al., 2020). Therefore, it is likely that in addition to ST2 induction, IL-33 synergies with IL-12 through similar pathways than IL-18.

Compared to other NK cell activating signals (IL-2, IL-15, IFN- α), IL-12 is the most potent signal to endow NK cells with strong ability to respond to IL-33 and secrete high levels of IFN- γ . IL-2 and IL-15 activates mainly STAT-5 (Liao et al., 2011) whereas IFN- α activate STAT1/2 (Platanias, 2005) signaling pathways, which could be less efficient to induce ST2 expression. Of note, stimulation with anti-NKaR agonistic antibodies or target cells did not elicit NK cells' response to IL-33, highlighting major role of cytokines in the regulation of IL-33-responsiveness.

IL-12 induces ST2 expression and IL-33 responsiveness on a subset of CD56^{dim} NK cells and these features progressively decreased along the NK cell differentiation towards CD57⁺ CD56^{dim} NK cells. On the contrary, CD56^{bright} NK cells constitutively express IL-1R1 and are responsive to IL-1 α and IL-1 β , whereas both CD56^{bright} and CD56^{dim} NK cells express IL-18R1 and respond to IL18 at steady state. Our findings therefore highlight differences in NK cell subsets' ability to respond to IL-1 family members. Strikingly, only IL-33 was able to potentiate sustained proliferation in response to IL-2 in CD56^{dim} NK

cells, which are known to show very low proliferative ability (Lutz et al., 2011). Similar results were obtained during MCMV infection in mice where ST2 is required for optimal proliferation of naive and MCMV-specific adaptive NK cells (Nabekura et al., 2015). Of utmost importance, among cytokines of IL-1 family used in combination with IL-12, IL-33 was unique in its ability to concomitantly induce secretion of IFN- γ , TNF- α , CCL3, CCL4, and CCL5 by CD56^{dim} NK cells. IL-33 was even more potent than IL-18 to induce TNF- α , CCL3 and CCL4 production by these cells. This observation is in agreement with a recent study showing that IL-33 triggers concomitant IFN- γ and TNF- α by NK cells (Ochayon et al., 2020). However, this is in sharp contrast to the established knowledge that CD56^{bright} NK cells are mainly responsible for the production of a broad spectrum of pro-inflammatory cytokines and chemokines while terminally differentiated and memory-like or adaptive CD56^{dim} NK cells usually produce less cytokines (Min-Oo et al., 2013; Schlums et al., 2015; Hammer and Romagnani, 2017). IL-33 and IL-12 synergy also increased NK cell cytotoxicity toward target cells. Altogether, our results demonstrate that ST2⁺ NK cells are polyfunctional, sharing properties of both CD56^{bright} and CD56^{dim} NK.

Tremendous transcriptional modifications were identified in NK cells in the course of differentiation from CD56^{bright} to CD56^{dim}, defining specific transcriptional signatures for both subset (Hanna et al., 2004; Crinier et al., 2018; Collins et al., 2019). Concomitantly, several groups reported intermediate NK cell subsets characterized by the absence of CD57 and KIRs expression, and expression of surface markers such as CD94/NKG2A, CD62L or CX3CR1 (Lopez-Vergès et al., 2010; Björkström et al., 2010; Yu et al., 2010; Hamann et al., 2011). More recently, important epigenetic remodeling were identified and associated with transcriptional programs regulating NK cells' differentiation and maturation both in physiological and pathological contexts (Lau et al., 2018; Collins et al., 2019). Our transcriptional analysis of NK cells subsets identifies ST2⁺ NK cells as a unique subpopulation characterized by an intermediate transcriptional program endowing them with phenotypical and functional markers from both canonical CD56^{bright} and CD56^{dim} NK cells, consistent with their polyfunctionality in response to IL-12 and IL-33 stimulation *in vitro*.

IL23R, *IL2RB*, *IL2RA*, *IL12RB2* encoding cytokine receptors were enriched in ST2⁺ NK cells compared to other NK cells subsets, in favor of their higher potential to respond to cytokine stimuli, as observed in this study in response to IL-12 and IL-33 (cytokine production) and IL-2 (proliferation). The co-expression of *ST2* and *IL23R* also suggests a specific cooperation between IL-23 and IL-33 for a unique NK cell function. ST2 expression thus identifies a polyfunctional CD56^{dim} NK cells subset highly responsive to cytokine stimulation of specific interest to mount polyvalent and long-lasting immune response against heterogeneous tumors. Strikingly, relative expression of genes related to CD56^{bright} or CD56^{dim} NK cells in ST2⁺ NK cells reveals a continuum in gene expression during NK cell differentiation suggesting a model where ST2⁺ NK cells would originate from CD56^{bright} NK cells and further differentiate in CD56^{dim} NK cells. CD57 was previously reported as a marker of terminally differentiated CD56^{dim} NK cells that expand upon viral challenge and are highly cytotoxic (Lopez-Vergès et al., 2011; Collins et al., 2019). Interestingly, CD57⁻ ST2⁺ NK cells were closer to CD56^{bright} NK cells whereas CD57⁺ ST2⁺ NK cells shared more homology with CD57⁻ CD56^{dim} and to a lesser extent with CD57⁺ CD56^{dim} NK cells, in favor of an early development of ST2⁺ cells during NK cells differentiation. Although *ST2* expression was enriched in CD57⁻ CD56^{dim} NK cells, we also observed a significant proportion of CD57⁺ ST2⁺ NK cells, suggesting a concomitant regulation of these surface markers during NK cells differentiation, in agreement with models proposed for the regulation of CD57 and KIRs expression (Björkström et al., 2010; Fauriat et al., 2010).

We demonstrate that IL-12 induces ST2 expression through STAT-4 phosphorylation. However, only a subset of CD56^{dim} NK cells acquire ST2 expression in response to IL-12 and ST2 expression and IFN- γ production is gradually lost with the acquisition of CD57 and KIRs expression in CD56^{dim} NK cells. *IL12RB2* expression is gradually lost with the acquisition of ST2 and CD57 expression, with the lowest

levels observed in CD57⁺ CD56^{dim} NK cells suggesting that loss of IL-12R β subunit directly prevents ST2 expression in ST2⁻ CD56^{dim} NK cells. Although CD56^{bright} express high levels of *IL12RB2* and strongly responded to IL-12 they were never able to express ST2, suggesting blocking mechanisms downstream of STAT-4 signaling. Specific transcriptional and epigenetic negative regulators for ST2 expression in CD56^{bright} NK cells remains to be identified. Interestingly, genes encoding BACH2 and TCF7, master transcription factors in CD56^{bright} NK cells, were specifically downregulated in ST2⁺ NK cells and might act as transcriptional repressors preventing ST2 expression in CD56^{bright} NK cells.

Although IL-33 was for many years considered as an alarmin involved in pathologies linked to type-2 immune responses (Hardman and Ogg, 2016), numerous recent reports have also implicated IL-33 in the regulation of tumor development (Liew et al., 2016). Here we provide evidences of IL-33 nuclear expression within tumor tissue in breast cancer, mostly in endothelial and stromal cells, in line with IL-33 nuclear expression reported in fibroblasts associated with head and neck (Chen et al., 2013), gastric (Su et al., 2015) and colorectal cancers (Cui et al., 2015; Landskron et al., 2019) and in immune cells within the stroma in colorectal cancer (Landskron et al., 2019). Similarly to its release during type-2 immune responses, IL-33 expression is found in patients serum and tumor tissue from a variety of cancers (Zhang et al., 2012; Maywald et al., 2015; Yang et al., 2016; Tong et al., 2016). Stromal cells expressing IL-33 could therefore represent an important source of IL-33 in response to increased cell damage and death in the tumor microenvironment. We did not detect any IL-33 expression in malignant tumor cells in breast cancer, in contrast to previous reports in colon, small intestine (Maywald et al., 2015; Mertz et al., 2016), and head and neck (Rössle et al., 2016) cancers. However, we detected IL-33 nuclear expression in normal mammary acini in cells which could be identified as myoepithelial cells regarding their location. More generally, we document a frequent downregulation of *IL33* expression in tumoral tissue compared to adjacent normal tissue in several organs. Together, our results support an anti-tumor role for endogenous IL-33 and loss of its expression during tumorigenesis may unravel an immune escape mechanism. Consistently, IL-33 levels are inversely correlated with tumor grade and tumor size in lung adenocarcinomas (Yang et al., 2018) and osteosarcomas (Koster et al., 2018). We also report that IL-33 expression is strongly associated with longer overall survival in several types of cancers including BC, suggesting a protective role of IL-33. Our results are in agreement with positive prognostic impact of IL-33 observed in hepatocarcinoma, kidney, salivary glands or prostate cancers (Brunner et al., 2015; Saranchova et al., 2016; Rössle et al., 2016).

Since IL-33 has been reported to act on a variety of immune cells, capable of either promoting and suppressing tumor development (Cayrol and Girard, 2018), its ultimate function in tumor immunity is challenging to decipher and studies exploring IL-33/ST2 signaling in tumor growth have yielded contradictory results (Fournié and Poupot, 2018). Part of the confusion regarding IL-33's role in tumor development lies in its opposing roles depending on immune microenvironment and tumor stage. We observed that blood and tumor-infiltrating NK cells isolated from BC patients respond *ex vivo* to IL-33 in combination to IL-12. *In vitro*, IL-33-response is gradually lost when IL-12 is removed from culture medium suggesting the absolute requirement for IL-12 to maintain NK cells' response to IL-33 (data not shown). IL-12 production attributed to DCs or macrophage activation was observed in tumors (Zitvogel and Kroemer, 2014; Broz et al., 2014; Mittal et al., 2017; Böttcher et al., 2018; Hubert et al., 2020; Ramos et al., 2020) and is essential to allow NK cells anti-tumor activity (Mittal et al., 2017). However, a decrease in IL-33/IL-12 ratio during tumor progression has been reported and associated with a type-2 over type-1 imbalance and cancer progression in BC (Jafarzadeh et al., 2015). We therefore suggest that IL-33 activity in tumor microenvironment is fine-tuned by cytokines and more specifically, we identify IL-12 as a co-signal able to drive its anti-tumor activity. Accordingly, although we detected significant levels of IL-12p40, we were not able to detect the bioactive form IL-12p70 in supernatants obtained

from advanced breast tumor. We can not rule out IL-12 production by DC or macrophages in tumor-draining lymph nodes but this result suggests that loss of IL-12 expression in clinically progressing tumors can prevent NK cells' response to IL-33.

Our results *in vivo* demonstrate a potent antitumor role for IL-33 on primary mammary tumor growth following peritumoral administrations of IL-33 combined with IL-12, through NK cell activation and IFN- γ production. Our results support the previous reports of NK cell contribution to antitumor immunity *via* IFN- γ production following ectopic expression (Gao et al., 2013, 2015; Jin et al., 2018) and upon systemic administration of IL-33 (Long et al., 2018; Qi et al., 2020). Interestingly, local and systemic activation of NK cells following IL-33 injection was also shown to participate in the control of metastasis in BC model (Qi et al., 2020), suggesting that IL-33-dependent NK cell activation might be of greater importance than described here. Unfortunately, we could not test this hypothesis in the low metastatic E0771 breast cancer model we used. Together, these results build a strong rationale to evaluate benefits of using IL-33 in combination with other treatments targeting the immune system such as immune checkpoint blockade, cancer vaccines or immunomodulating drugs.

Collectively, our data reveal a new understanding of IL-33's role in antitumor immunity via NK cell activation. Deciphering NK cell differentiation path and identify stimuli which can specifically trigger different maturation stages is crucial to achieve tailored harnessing of NK cell features for therapeutic benefit in a variety of pathological contexts. The characterization of IL-33 as new potent activator of a defined polyfunctional NK cells endowed with anti-tumor activity *in vitro* and *in vivo* in a mammary mouse tumor model and with relevance in BC patients is of particular interest for the development of innovative NK based anti-tumor therapies. In conclusion, our data indicate that IL-33 can represent an additional weapon in the arsenal of NK cell-based therapies to efficiently and durably defeat tumor cells.

Material and methods

Human primary NK cells isolation from healthy donors

Mononuclear Peripheral Blood Cells (PBMCs) were isolated from whole blood of healthy donors (agreement with EFS Rhone-Alpes) by density gradient centrifugation on Lymphocyte Separation Medium (Eurobio). Total NK cells were purified by negative immune-selection using Human NK cell isolation kit (Miltenyi) following manufacturer's instructions and purity always exceed 95%. Cells were cultured in RPMI GlutaMAX/10% FBS/1% penicillin-streptomycin (complete RPMI, cRPMI).

Cell activation and blocking experiments

Human primary PB NK cells were cultured in cRPMI supplemented with IL-12 (Miltenyi), IL-15 (Peprotech), IL-2 (Chiron), IFN- α 2b (Schering-Plough), IL-1 α (Peprotech), IL-1 β (Peprotech), IL-18 (MBL) or IL-33 (Miltenyi) at concentrations indicated in figure legends. NKp46 and NKp30 agonist antibodies (R&D) were coated (1 μ g/mL) in NUNC 96-well plates (Thermofisher) overnight at 4°C. For blocking experiments, cells were incubated with anti-ST2 (10 μ g/mL, R&D), anti-IL-18 (1 μ g/mL, MBL), mIgG1 (1 or 10 μ g/mL, R&D) antibodies or IL-1RA (100ng/mL, Peprotech).

IFN- γ Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) detection

IFN- γ levels were measured in culture supernatants using human IFN- γ ELISA kit (R&D) following manufacturer's instructions.

Killing assay

PB NK cells were activated with IL-1 family members (10ng/mL) alone or in combination with IL-12 (10ng/mL) for 24hrs and washed 3 times. K562 cells were labeled with calcein (Invitrogen) at 10 μ L/mL in cRPMI during 30min at 37°C, washed twice, and fixed with sulfinpyrazone (4mM, Sigma-Aldrich). NK cells were incubated with K562 target cells at indicated effector:target ratio for 4hrs à 37°C. Calcein release was measured using Clariostar (Labtech) and the percentage of specific lysis was calculated as followed: % of lysis = ((Fluo_{measured}-Fluo_{spontaneous release})) / ((Fluo_{max}-Fluo_{spontaneous release})) x 100

Flow cytometry

Cells were stained for the expression of surface markers using antibodies listed in Table 1 for 30min at 4°C. Cell viability was determined using Zombie dye (Biolegend) following manufacturer's instructions. For intracellular IFN- γ staining, GolgiPlug (BD Bioscience) was added in culture media 4hrs prior to the staining. Cells were stained for the expression of surface markers as previously described, fixed and permeabilized using FoxP3/Transcription Factor Staining Buffer Set (eBioscience) prior to intracellular staining for 30min at 4°C. Cells were washed twice with PBS prior to acquisition on LSRII Fortessa flow cytometer (BD Biosciences). Results were analyzed using FlowJo software (Tree Star Inc.).

Quantitative real-time PCR

Total RNA extraction was performed using NucleoSpin RNA Kit (Macherey-Nagel) following the manufacturer's instructions. Reverse transcription was performed with iScript Reverse Transcription kit (BioRad) using 350ng total RNA extract. Real Time quantitative PCR (RT-qPCR) analysis was performed using TaqMan gene expression assay with *ST2* and *IL-1RAcP* specific primers (Hs00249384_m1 and Hs00895050_m1 respectively, Life Technologies). Normalization of *ST2* expression was performed using *GADD45a* (Hs00169255_m1, Life Technologies) expression.

St2 promoter region analysis

Human *St2* gene sequence was obtained from Gen-Bank and then submitted to Eukaryotic Promoter Databank (EPD, Dreos et al., 2015) to identify *St2* promoter region. Putative binding sites for transcription factors in *St2* regulating region were identified using PROMO database (Farré et al., 2003).

p-STAT-4 Chromatin Immuno-Precipitation (Ch-IP)

PB NK cells were stimulated or not with IL-12 as previously described and Ch-IP was performed using ChIP-IT PBMCs Kit (Active Motif) according to the manufacturer's instructions. Briefly, cells were cross-linked with 1% formaldehyde then sonicated on ice for 6min (6 cycles of 1min; 30sec on / 30sec off) at 4°C using water bath-sonicator (Diagenode). Chromatin fragments were reversed cross-linked overnight at 65°C and 500ng of each input DNA was electrophoresed on 1% agarose gel to confirm fragments size were between 200 to 1500bp. p-STAT-4 immuno-precipitation was performed overnight at 4°C using anti-p-STAT4 antibody (Cell signaling). p-STAT-4 immuno-precipitation was validated by Western Blot using pre- and post-immuno-precipitated samples stained with anti-p-STAT-4 (Cell Signaling). Isolated DNA fragments were purified and quantitative PCR analysis was performed using 1 μ g of DNA as template. Primers for *ST2* promoter region were extracted from (Baba et al., 2012) and we used *PRF1* (Cell Signaling) and Negative Primer Set 1 and 2 (Active Motif) as positive and negative controls for p-STAT-4 binding (see Table 1 for sequences). Ct Value of each sample was normalized to input DNA fraction and fold-change for p-STAT-4 binding was calculated using $\Delta\Delta$ ct method. qPCR analysis was done in triplicates for each samples.

Phosphorylation flow cytometry analysis

For p-STAT4 analysis, NK cells were activated or not with IL-12 (0,1ng/mL; 1ng/mL or 10ng/mL) for 1hr. For p-NF- κ B, p-p38 and p-S6 analysis, NK cells were activated or not with IL-12 (10ng/mL) for 24hrs. When indicated, IL-1 family members were added during 5min for p-NF- κ B and p-p38 and 1hr for p-S6 analysis. Cells were then fixed with Lyse/Fix Buffer (BD Biosciences) for 10min at 37°C and permeabilized with Perm Buffer III (BD Biosciences) for 30min on ice following the manufacturer's instructions. Cells were then stained for 45min at room temperature, washed and directly acquired as previously described.

Proliferation assay

NK cells were stained with 5 μ M Cell Trace Violet (CTV) (Invitrogen) for 20min at room temperature, washed twice, and activated with IL-1 family members (10ng/mL) with or without IL-12 (10ng/mL) for 24hrs in RPMI supplemented with 20% SAB. After three washes, IL-2 (100UI/mL, Chiron) was added and CTV signal was analyzed by flow cytometry on day 3 and 6 for CD56^{bright} and CD56^{dim} respectively.

Luminex immunoassay

Culture supernatants of activated NK cells were harvested to perform IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, IL-8, CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP-1 β), CCL5 (RANTES), IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17A, IL-22, and G-CSF quantification using a human Bio-plex PRO assay (Biorad) following manufacturer's instructions and acquired with Luminex200 instrument (Luminex).

Cell sorting

Purified NK cells were stained with antibodies for CD3, CD56, CD16, CD57 (see Table 1) as previously described, FACS sorted using FACS Aria II (BD) and collected in cRPMI. Cell viability was determined by DAPI (1 μ g/mL, Invitrogen).

RNAseq

PB NK cells were FACS sorted as previously described. 400.000 cells from each population were resuspended in 350 μ L TCL lysis buffer (Qiagen) supplemented with 1 % β -mercaptoethanol. Total RNA extraction was performed using Single Cell RNA Purification Kit (Norgen) following the manufacturer's instructions, including an additional treatment with rDNAse (Qiagen) to avoid DNA contamination. RNA quality was addressed using 4200 TapeStation (Agilent) automated electrophoresis with RIN always exceeding 8, and total RNA was quantified using Qubit™4 Fluorometer (ThermoFischer). Reverse transcription and DNA amplification was performed with SmartSeqV4 (Takara) using 10 ng of RNA as template. DNA library was prepared with Nextera XT DNA library Prep kit (Illumina), hybridized on NovaSeqS1 Flow cell and sequenced on NovaSeq sequencing platform (Illumina) with a paired-end protocol. Raw sequencing reads were aligned on the human genome (GRCh38) with STAR (v2.7.3a) and the annotation of known genes from gencode v33. Gene expression was quantified using Salmon (v1.1.0) and the annotation of protein coding genes from gencode v33.

RNAseq Bioinformatic analysis

All analyses were performed in R programming language (v3.6.3). DESeq2 (v1.26.0) was used to normalize raw counts, to generate principal component analysis (PCA) plot based on the 500 most variable genes and to identify differentially expressed genes (DEGs). To identify NK subset signatures, DEG between one subset compared to the two other subsets of NK cells were filtered considering a log2 fold change (LFC) > 1 and an adjusted p value < 0.001, resulting in 234 genes enriched in ST2⁺, 396 genes enriched in CD56^{dim} and 418 genes enriched in CD56^{bright} NK cells. These signatures were scored by ssGSEA using the GSVA package. The Morpheus tool (Broad Institute) was used to generate a heatmap representing the relative expression of these DEGs, using an unsupervised hierarchical clustering of

genes and samples based on the one minus Pearson correlation metric. To evaluate the intermediate state of ST2⁺ NK cells compared with CD56^{bright} and CD56^{dim} NK cells, DEG between one subset compared to the two other subsets of NK cells were filtered considering a log₂ fold change (LFC) > 1 and an adjusted p value < 0.05. The Morpheus tool (Broad Institute) was used to generate a heatmap representing their relative expression. For this heatmap, genes were classified as following: upregulated DEG in CD56^{bright} NK cells (n = 828 genes), downregulated DEG in CD56^{dim} NK cells (n = 1,348 genes), up regulated DEG in ST2⁺ NK cells (n = 547 genes), downregulated DEG in CD56^{bright} NK cells (n = 1,009 genes) and upregulated DEG in CD56^{dim} NK cells (n = 1,024 genes).

TCGA analysis

log₂ (RSEM+1) normalized expression and clinical outcome datasets from The Cancer Genome Atlas (TCGA) were downloaded from the cBioPortal (provisional data, February 2018 http://www.cbioportal.org/data_sets.jsp) for 14 tumor types: bladder carcinoma (BLCA), breast invasive carcinoma (BRCA), colorectal adenocarcinoma (COAD), brain lower grade glioma (LGG), head and neck squamous cell carcinoma (HNSC), kidney renal papillary cell carcinoma (KIRP), liver hepatocellular carcinoma (LIHC), lung adenocarcinoma (LUAD), ovarian serous cystadenocarcinoma (OV), pancreatic adenocarcinoma (PAAD), prostate adenocarcinoma (PRAD), skin cutaneous metastatic melanoma (SKCM), stomach adenocarcinoma (STAD) and thyroid cancer (THCA) to compare gene expression in tumor *versus* peritumoral healthy tissue. For breast cancer analysis, tumors were further stratified according to their molecular subtype to analyze IL-33 log₂ (RSEM+1) normalized expression and clinical impact. Overall survival analyses and plots were performed with R software v 3.6.0, using the packages survival and survminer. For each gene, patients were stratified into into tercile according to normalized gene expression level in log₂ (RSEM+1) to compare top (*i.e.* high) and bottom (*i.e.* low) tercile. The log-rank test was used to determine statistical significance for overall survival between the two groups of patients. For multivariate analysis in breast cancer dataset, a cox model including the main prognosis factor (Age, Molecular subtype and Stage) was used. Sex was removed from the model due to the low number of male in the study.

TMA analysis

Human breast cancer tissues used for the ngTMA were provided by the Tissue Bank Bern. Donors of breast tissues gave written informed agreement and analyses of the samples were approved by the Cantonal Ethics Committee of Bern (200/2014 and 2018-01502). Tumor next-generation tissue microarray (ngTMA) consisting of n = 199 BCs of non-special type was constructed. Briefly, two 1 mm punches for each patient, taken from the tumor bud areas in the periphery and within the tumor center, were formalin-fixed and paraffin-embedded (PMID: 29254793). IL-33 staining was performed automatically using a BOND RX autostainer (Leica Biosystems). Sections were first deparaffinized and antigen was retrieved using Tris buffer (pH 9.0) for 30 min at 95 °C. Sections were then stained with goat anti-human IL-33 (R&D Systems, # AF3625; dilution of 1:400 for 30 min), with or without anti-human PanCK, clone AE1-AE3 (Agilent, # M351501-2; dilution of 1:400 for 15 min) primary antibodies. For IL-33 detection, rabbit anti-goat antibody (Agilent, # E0466) was used as secondary antibody, at a dilution of 1:400 for 15 min. Specific binding of primary antibodies was visualized using a polymer-based visualizing system with horseradish peroxidase as the enzyme and 3,3-diaminobenzidine (DAB) as a brown chromogen for IL-33, or an alkaline phosphatase-linked polymer and Fast Red as red chromogen (Bond™ Polymer Refine and Red Detection) for PanCK. Sections were counterstained with hematoxylin and mounted with Aquatex (Merck). Slides were scanned in high resolution on whole slide scanners Panoramic 250 Flash (3DHISTECH) or NanoZoomer S360 (Hamamatsu).

Breast tumors and patients blood analysis

Fresh breast tumors and blood samples (collected in EDTA anticoagulant-containing tubes) were obtained from the Biological Resources Center (BRC) of the Centre Léon Bérard (CLB, Lyon, France). All patients enrolled provided written informed consent. Protocol was reviewed and approved by the institutional Board of CLB. Sections of the resected tumor area selected by the pathologists were placed in RPMI supplemented with 100 IU/ml penicillin (Invitrogen) and 100µg/ml streptomycin (Invitrogen). Tissues were mechanically disrupted, supernatant was collected and frozen for subsequent cytokine and chemokine quantification by Luminex assay following manufacturer's instructions. Tumor pieces were then digested for 45 min at 37°C in RPMI supplemented with 100 IU/ml penicillin (Invitrogen) and 100µg/ml streptomycin (Invitrogen) using 1mg/ml of collagenase IV (Sigma Aldrich) and 20 µg/ml of DNase I (Sigma Aldrich). Digested samples were then filtered on a 70µm cell strainer and re-suspended in cRPMI for activation and flow cytometry analysis

Mice

7-week-old female C57BL/6J mice were purchased from Charles River Laboratories and *Rag2*-KO were bred in-house. All the experiments were performed under specific-pathogen free conditions and approved by the ethic committee (approval number CECCAPP-CLB-2019-017). Splenocytes isolated from C57BL/6J mice (CharlesRiver) were activated in cRPMI supplemented with IL-12 (Miltenyi), IL-1α (Miltenyi), IL-1β (Miltenyi), IL-18 (MBL) or IL-33 (Miltenyi). For tumor growth experiments, wild-type or *Rag2*-KO mice were injected orthotopically into the 4th mammary fat pad with 5×10^4 or 2.5×10^5 E0771 tumor cells in 200 µL of sterile NaCl at day 0. For NK cells depletion experiments, mice were injected intra-peritoneally with 200µg/mice of anti-NK1.1 antibody (BioXcell) or an equivalent volume of NaCl solution one day prior tumor cells injection and then once a week. To evaluate NK cells depletion efficiency, mice were treated with tetracaine analgesic eye drops and maintained under anesthesia using isoflurane to perform retro-orbital blood collection. Blood NK cell frequency was measured by flow cytometry. For therapeutic experiments, mice were injected with 10ng/mouse of rmlIL-12 (R&D) or 100ng/mouse of rmlIL-33 (Biolegend) alone or combined in 50µL directly in tumor area twice a week from day 2 to day 26. Control mice were injected with an equal volume of NaCl solution. Tumor sizes were monitored with a digital caliper (Mitutoyo) twice a week and expressed as volume of a sphere (smaller length)² × longer length) from day 9 to the end of experiments. Mice were sacrificed when longer length of the primary tumor reached >17mm². All cells were tested for mycoplasma prior injection using MycoAlert kit (Lonza). For serum collection, blood was collected as previously described on day 5, 4hrs after cytokine injection, incubated at RT for 30min to allow coagulation, centrifuged at 15 000rpm for 15min and serum was collected and aliquoted for preservation at -80°C. Serum IFN-γ levels were measured using Extra Sensitive IFN gamma Mouse ELISA Kit (ThermoFischer) following manufacturer's instructions.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad software and performed tests are indicated in figure legends. P-values lower than 0.05 were considered significant, with stars corresponding to * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001 and **** p <0.0001. If no stars indicated, no statistically significant differences were found. Of note, for some experiments with multiple comparisons on human samples, statistical significance could not be reached although significant differences probably due to high number of parameters regarding the number of replicates.

Figures

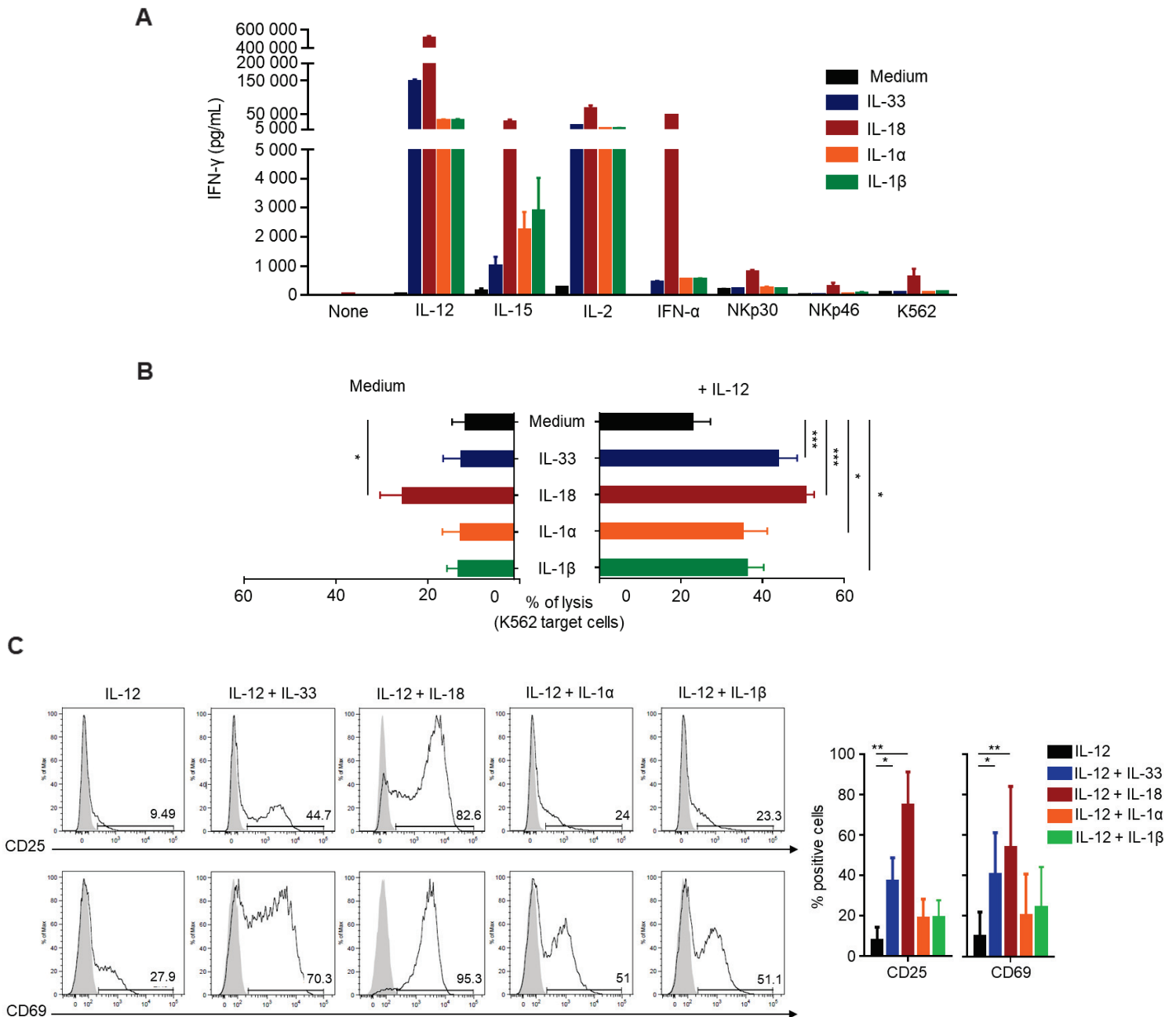
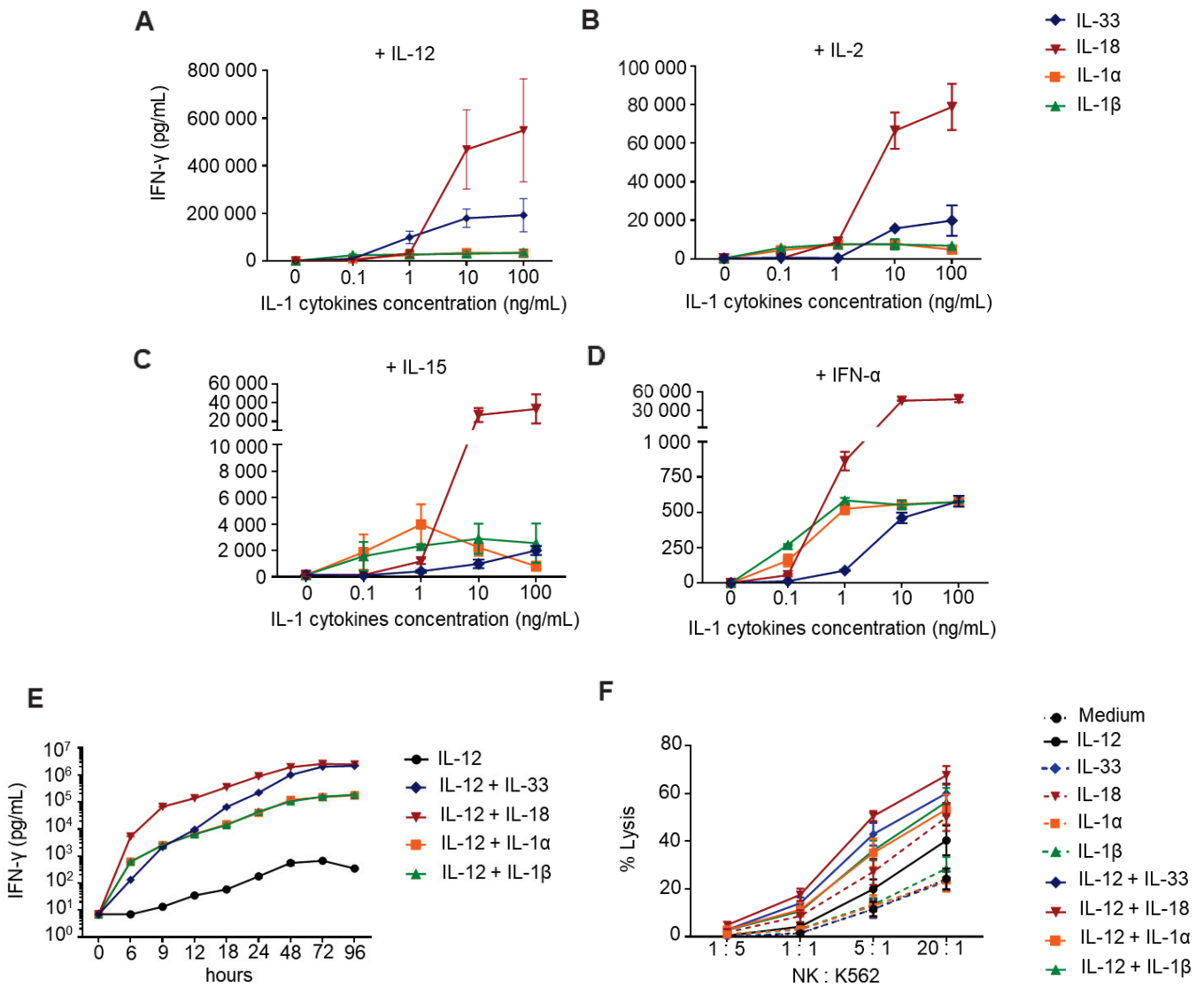


Figure 1. IL-33 in combination with IL-12 strongly activates NK cells secretory and cytotoxic functions

Human primary NK cells were isolated from healthy donors' blood and activated with IL-33, IL-18, IL-1 α or IL-1 β (10ng/mL each) alone or in combination with IL-12 (10ng/mL), IL-15 (10ng/mL), IL-2 (500UI/mL), IFN- α (500UI/mL), anti-NKp30 (1 μ g/mL), anti-NKp46 (1 μ g/mL) agonistic antibodies or K562 target cells. A/ Supernatants were collected at 24hrs and IFN- γ secretion was quantified by ELISA. Results are expressed as mean \pm SEM (n=4 independent experiments).

B/ NK cells were co-cultured with calcein-loaded K562 target cells for 4hrs at 5:1 effector to target ratio. Calcein release in supernatant was quantified by fluorometry to calculate lysis percentage. Results are expressed as mean \pm SEM (n=9 independent experiments). Two-way ANOVA followed by Tuckey's multiple comparisons test was performed.

C/ NK cells were stained for CD25 and CD69 (black line) or corresponding isotypic control (grey) after 24hrs. Representative histogram plots (left) and quantification (%) (right) of CD25⁺ or CD69⁺ NK cells after cytokine stimulation. Results are expressed as mean \pm SEM (n=4 independent experiments). Dunn's multiple comparisons test was performed.



Supplementary Figure S1. IL-33 in combination with IL-12 strongly activates NK cells secretory and cytotoxic functions

A-D/ Human primary NK cells were isolated from healthy donors' blood and activated with IL-33, IL-18, IL-1 α or IL-1 β (0.1 to 100ng/mL each) alone or in combination with A/ IL-12 (10ng/mL), B/ IL-2 (500UI/mL), C/ IL-15 (10ng/mL) or D/ IFN- α (500UI/mL) for 24hrs prior to supernatant collection and IFN- γ quantification by ELISA. Results are expressed as mean +/- SEM (n=4 independent experiments).

E/ NK cells were activated as described above and supernatants were collected at several time points from 0 to 96hrs prior IFN- γ quantification by ELISA (n=1).

F/ NK cells were activated with indicated cytokines (10ng/mL for each cytokine) for 24hrs and co-cultured with calcein-loaded K562 target cells for 4hrs at indicated effector to target ratio. Calcein release in supernatant was quantified by fluorometry to calculate lysis percentage. Results are expressed as mean +/- SEM (n=3 independent experiments).

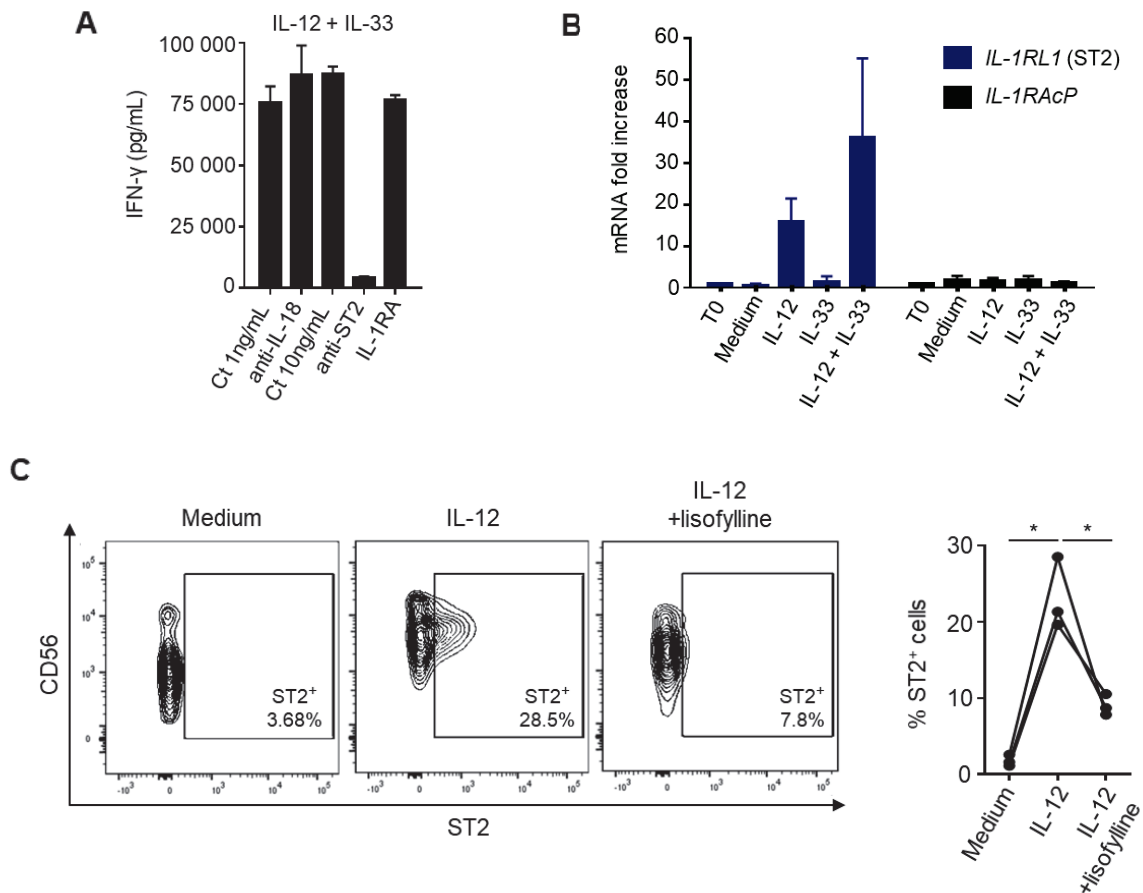


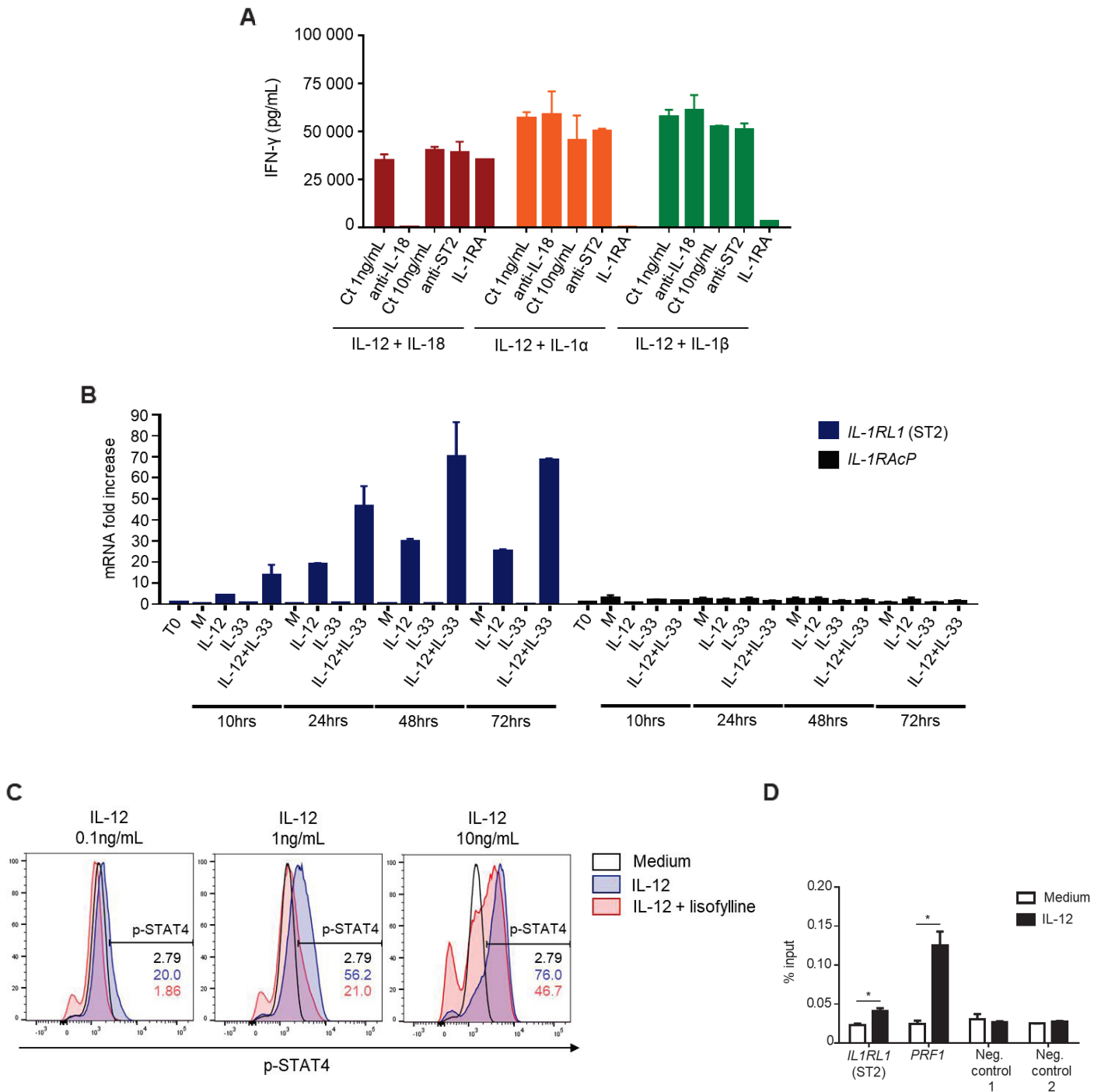
Figure 2. IL-12 induces ST2 expression on a subset of NK cells in a STAT-4-dependent signaling pathway

Human primary NK cells were isolated from healthy donors' blood and activated as indicated (10ng/mL each cytokines) for 24hrs.

A/ NK cells were activated in the presence of anti-ST2 (10ng/mL), anti-IL-18 (1ug/mL) blocking antibodies, IL-1RA antagonist (100ng/mL) or mlgG1 control antibody (1 or 10ng/mL as control for anti-IL-18 or anti-ST2 respectively). Supernatants were collected after 24hrs and IFN- γ secretion was quantified by ELISA. Results are expressed as mean +/- SD and are representative of three independent experiments.

B/ *ST2/IL1RL1* and *IL1RAcP* relative mRNA expression was analyzed by RT-qPCR activated as indicated. Results are expressed as mean +/- SD and are representative of two independent experiments.

C/ NK cells were activated as previously described, in the presence or not of Ilo (500 μ M) for 24hrs prior to ST2 surface expression analysis by flow cytometry. Representative dot plots (left) and quantification (%) (right) of ST2⁺ NK cells after cytokine stimulation. Results are expressed as mean +/- SEM (n=3 independent experiments). Dunn's multiple comparisons test was performed.



Supplementary Figure 2. IL-12 induces ST2 expression on a subset of NK cells in a STAT-4-dependent signaling pathway

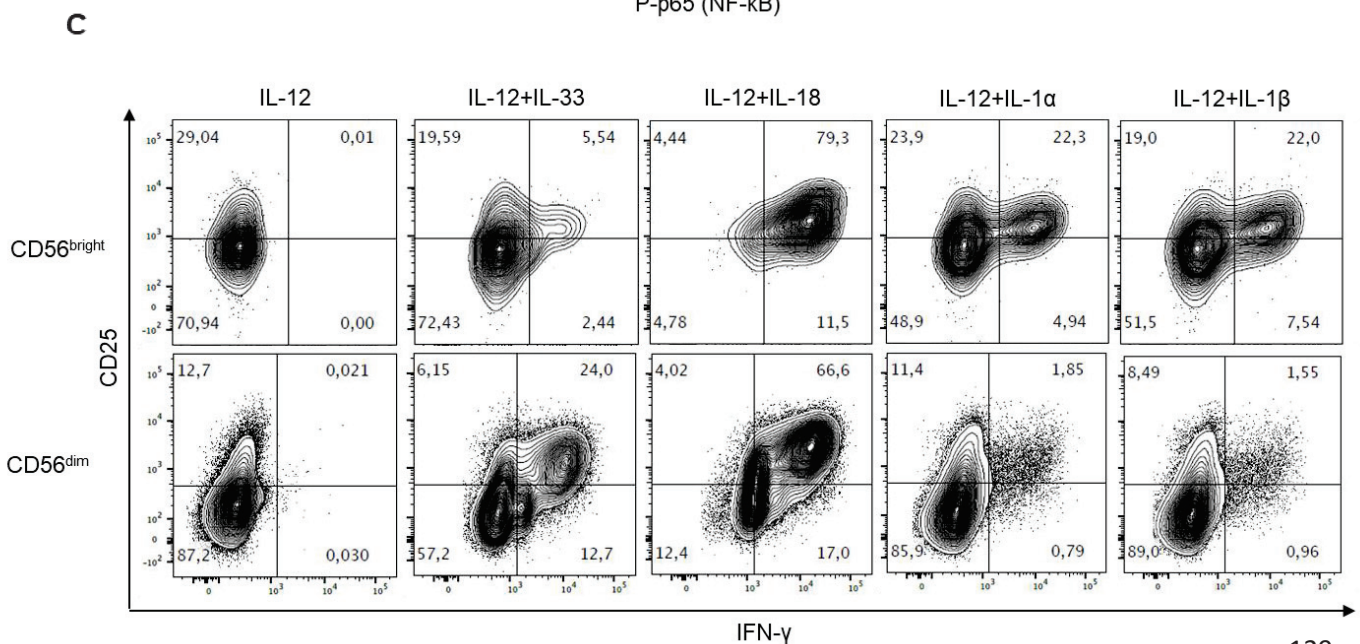
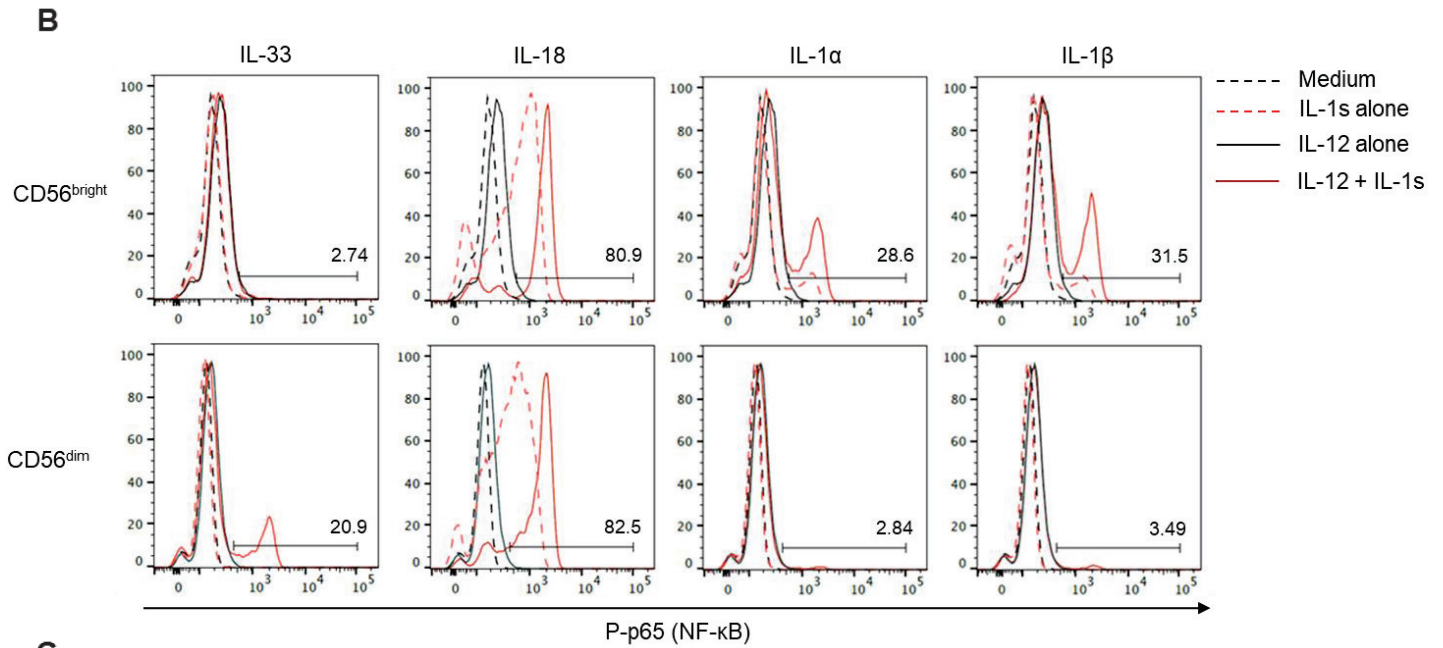
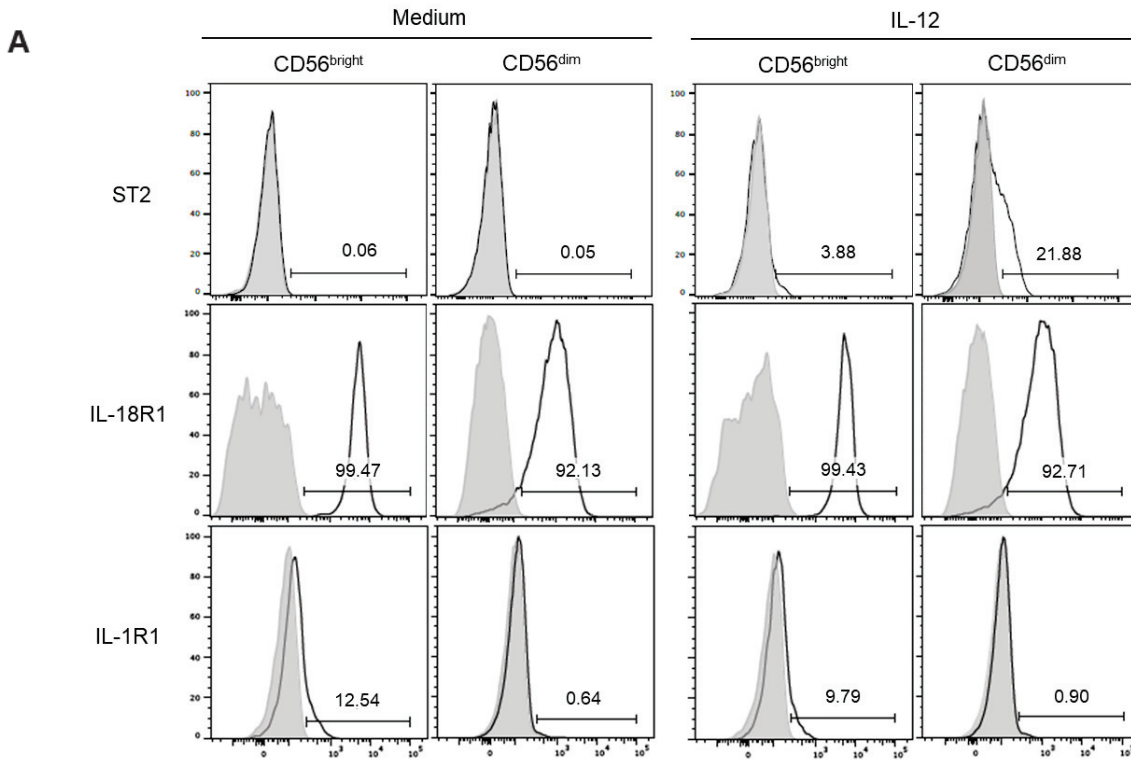
Human primary NK cells were activated as indicated (10ng/mL each cytokines)

A/ NK cells were activated in the presence of anti-ST2 (10ng/mL), anti-IL-18 (1 μ g/mL), IL-1RA antagonist (100ng/mL) or mIgG1 control antibody (1 or 10ng/mL as control for anti-IL-18 or anti-ST2 respectively). Supernatants were collected after 24hrs and IFN- γ secretion was quantified by ELISA. Results are expressed as mean \pm SD and are representative of three independent experiments.

B/ *ST2/IL1RL1* and *IL1RAcP* relative mRNA expression was analyzed by RT-qPCR at indicated times. Results are expressed as mean \pm SD and are representative of two independent experiments.

C/ NK cells were treated or not with lisofylline (500 μ M) 24hrs prior to activation with IL-12 (0.1 to 10ng/mL) for 5min and p-STAT-4 intracellular level was analyzed by flow cytometry (n=3 independent experiments).

D/ NK cells were immuno-precipitated for p-STAT-4 and RT-qPCR analysis was performed to calculate p-STAT-4 enrichment in *ST2* promoter region. *PERFORIN-1 (PRF1)* and negative control sets 1 and 2 were used respectively as positive and negative controls for p-STAT-4 binding. RT-qPCR analysis was done in duplicates for two experiments. Mann-Whitney test was performed.



D

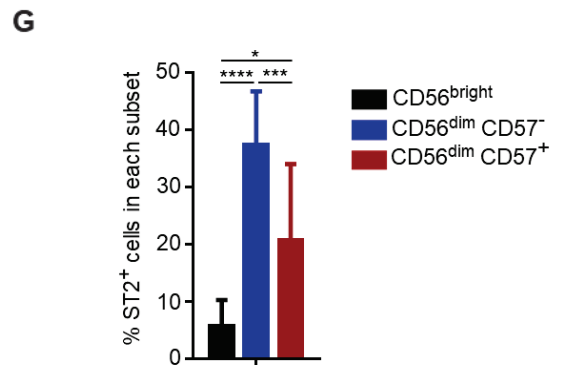
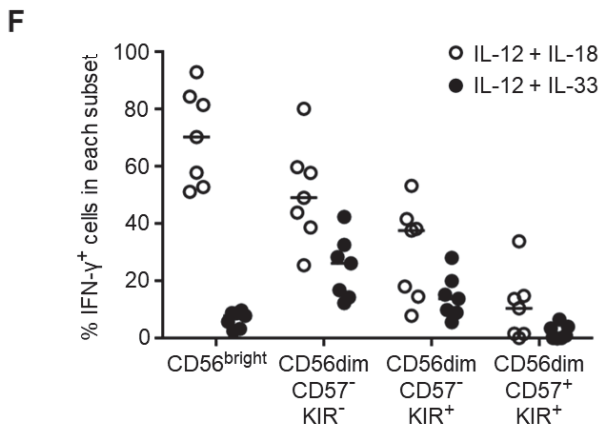
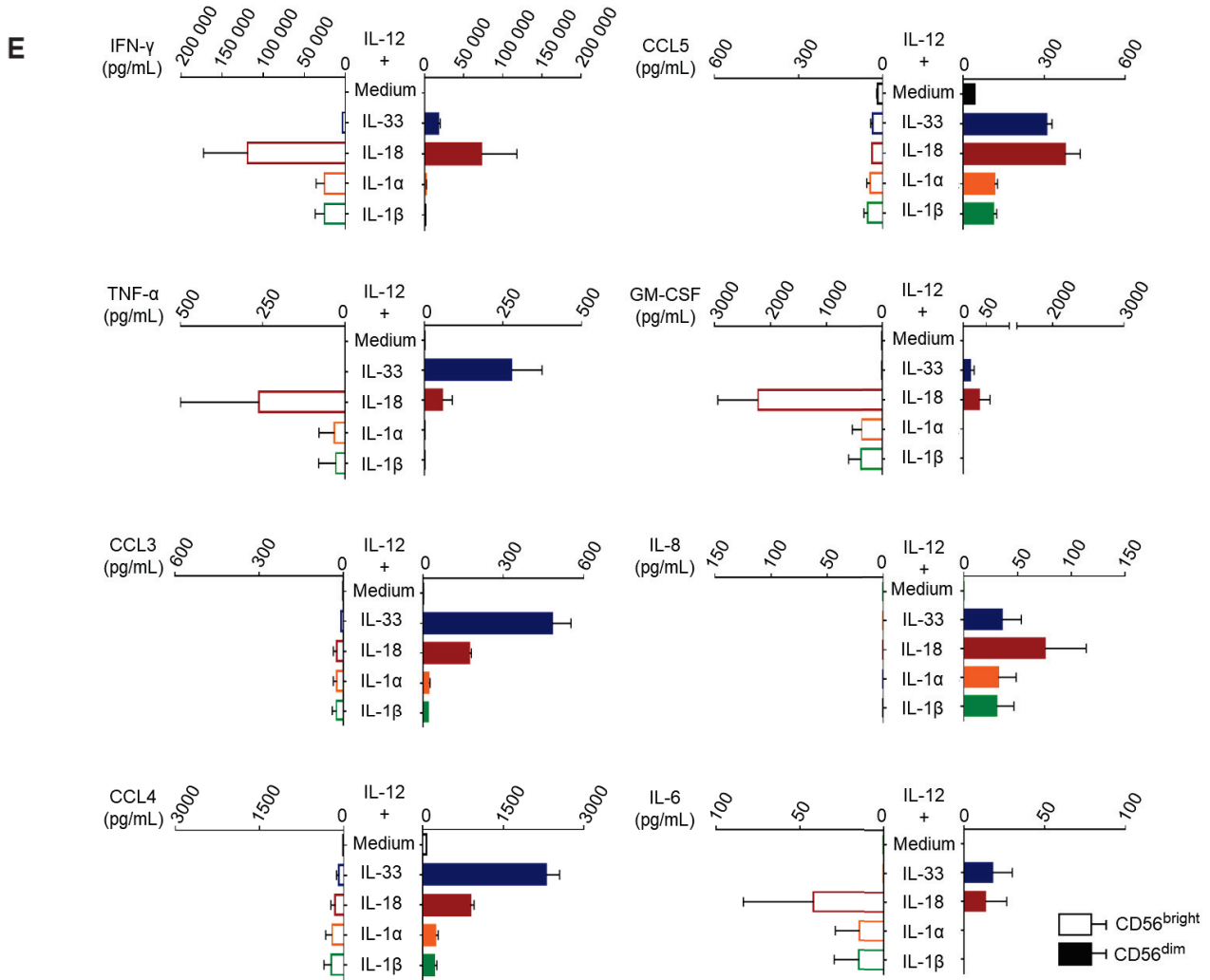
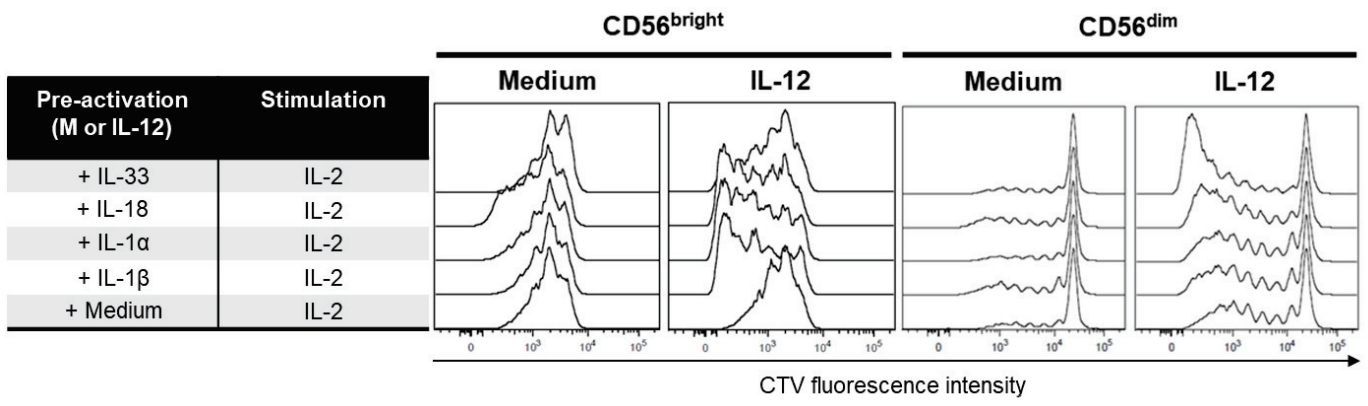


Figure 3. IL-33 preferentially activates a subset of CD56^{dim} NK cells

Human primary NK cells were activated as indicated (10ng/mL each cytokines) for 24hrs.

A/ ST2, IL-18R1, IL-1R1 expression (grey) or corresponding isotypic control (black line) was analyzed by flow cytometry. CD56 surface expression level was used to discriminate CD56^{bright} and CD56^{dim} NK cells (n=3 experiments).

B/ FACS-sorted CD56^{bright} and CD56^{dim} NK cells were activated with medium (dotted black line) or IL-12 alone (solid black line) for 24hrs prior to IL-33, IL-18, IL-1 α or IL-1 β addition, supplemented (solid red line) or not (dotted red line) with IL-12. p65 (NF- κ B) phosphorylation was analyzed 5min after the addition of IL-1 family cytokines (n=3 experiments).

C/ CD25 surface and IFN- γ intracellular expression was analyzed by flow cytometry. CD56 surface expression level was used to discriminate CD56^{bright} and CD56^{dim} NK cells (n=4 experiments).

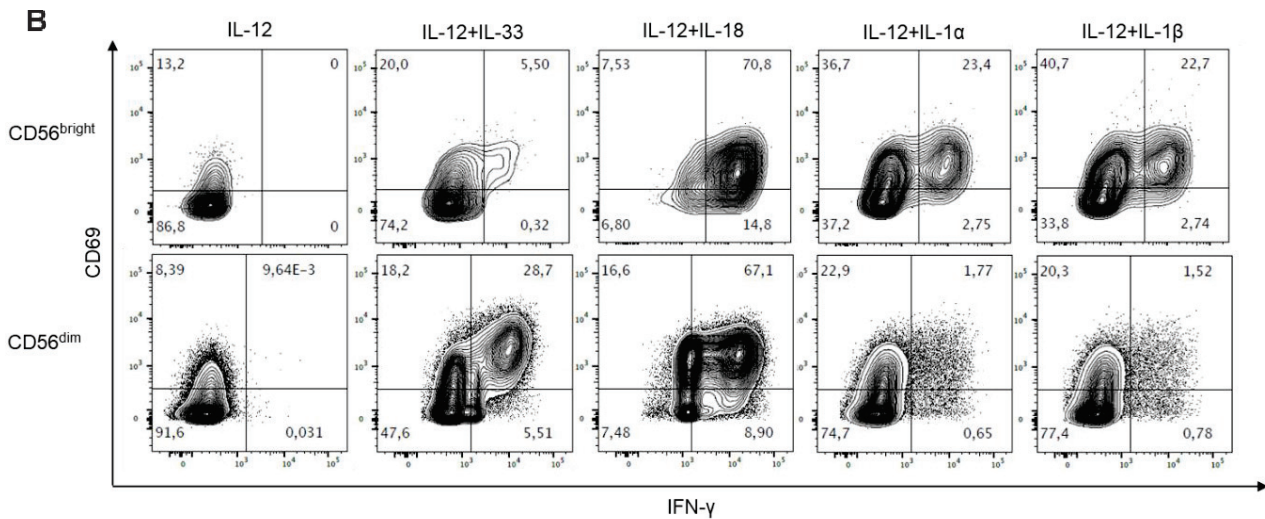
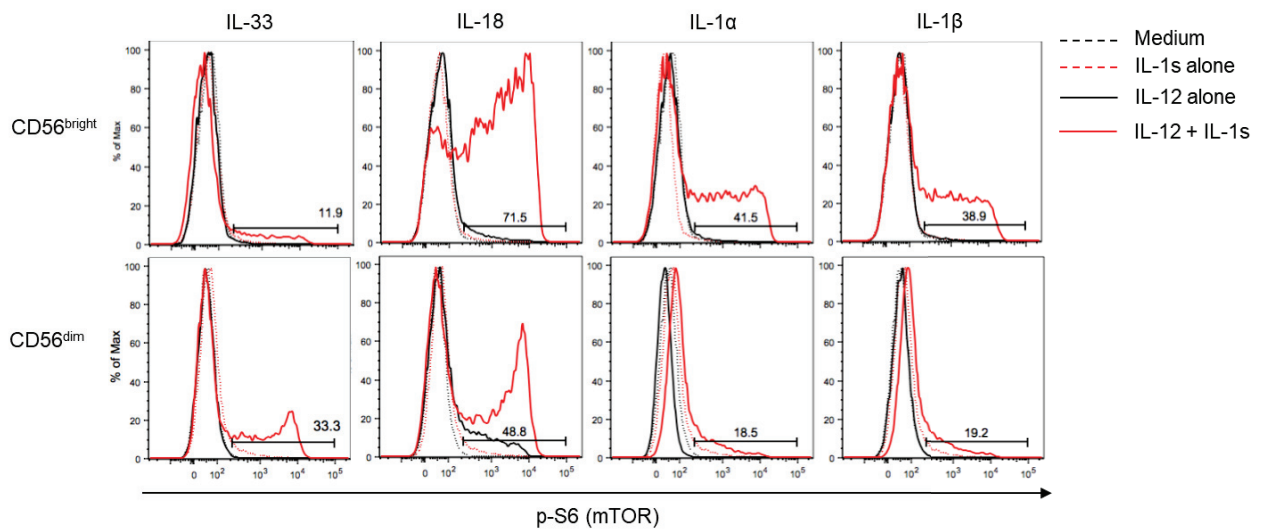
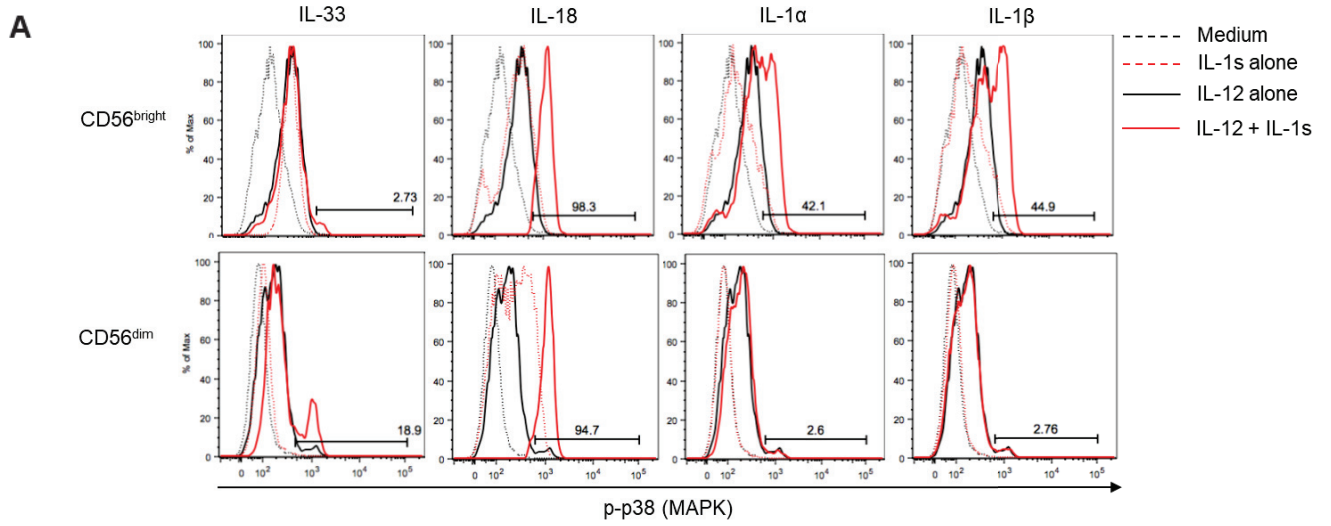
D/ FACS-sorted CD56^{bright} and CD56^{dim} NK cells were pre-activated as indicated for 24hrs. Cells were then stained with CTV for 20min, and washed prior to IL-2 (100UI/mL) stimulation. CTV fluorescence was analyzed on day 3 for CD56^{bright} and on day 6 for CD56^{dim} NK cells to quantify IL-2-induced NK cells proliferation (n=3 experiments).

A-D/Plots are representative of at least three independent experiments.

E/ Supernatants from FACS-sorted CD56^{bright} (empty histogram) and CD56^{dim} (filled histogram) NK cells were collected to quantify cytokines and chemokine release by Luminex assay. Results are expressed as mean +/- SEM (n=3 independent donors).

F/ Human primary NK cells were activated with IL-12 and IL-33 (black dots) or IL-12 and IL-18 (white dots) combinations (10ng/mL each cytokine) for 24hrs. Then IFN- γ intracellular expression was analyzed by flow cytometry on NK cells subsets based on CD56, CD57 and KIR surface expression (n=7 experiments).

G/ Human primary NK cells were activated with IL-12 (10ng/mL) for 24hrs. ST2 expression was analyzed by flow cytometry on NK cells subsets based on CD56 and CD57 surface expression. Results are expressed as mean +/- SEM (n=10 independent experiments). Dunn's multiple comparisons test was performed.



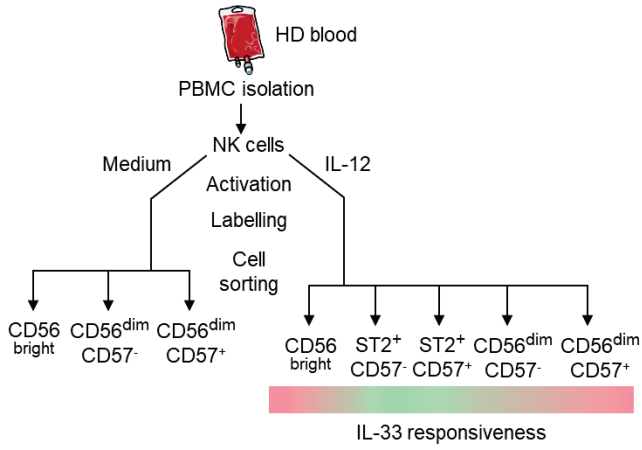
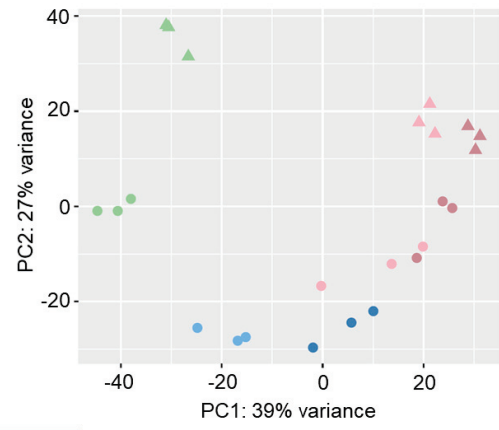
Supplementary Figure S3. IL-33 preferentially activates a subset of CD56^{dim} NK cells

Human primary NK cells were activated as indicated (10ng/mL each cytokines) for 24hrs.

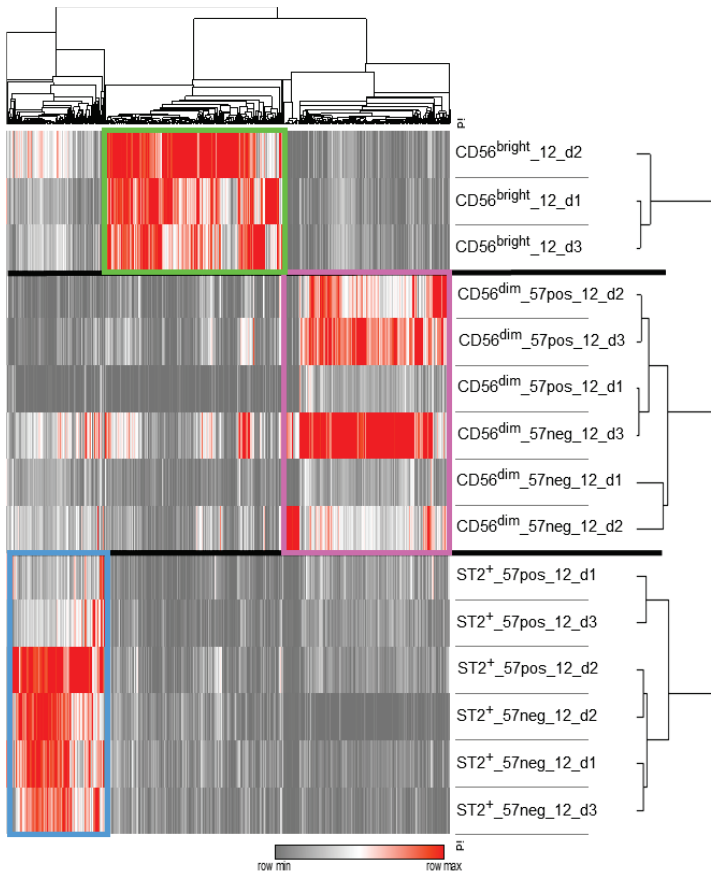
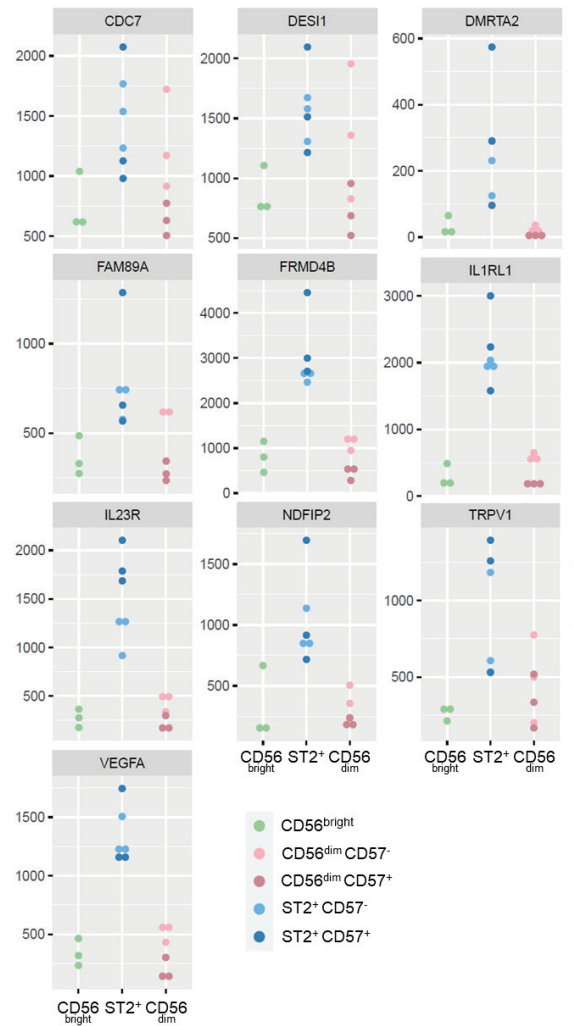
A/ FACS sorted CD56^{bright} and CD56^{dim} NK cells were activated with medium (dotted black line) or IL-12 alone (solid black line) for 24hrs prior to IL-33, IL-18, IL-1 α or IL-1 β addition, supplemented (solid red line) or not (dotted red line) with IL-12. p38 (MAPK) and S6 (mTOR) phosphorylation were analyzed 5min or 1hr respectively after IL-1 family cytokines addition (n=3 experiments).

B/ CD69 surface and IFN- γ intracellular expression was analyzed by flow cytometry. CD56 surface expression level was used to discriminate CD56^{bright} and CD56^{dim} NK cells (n=4 experiments).

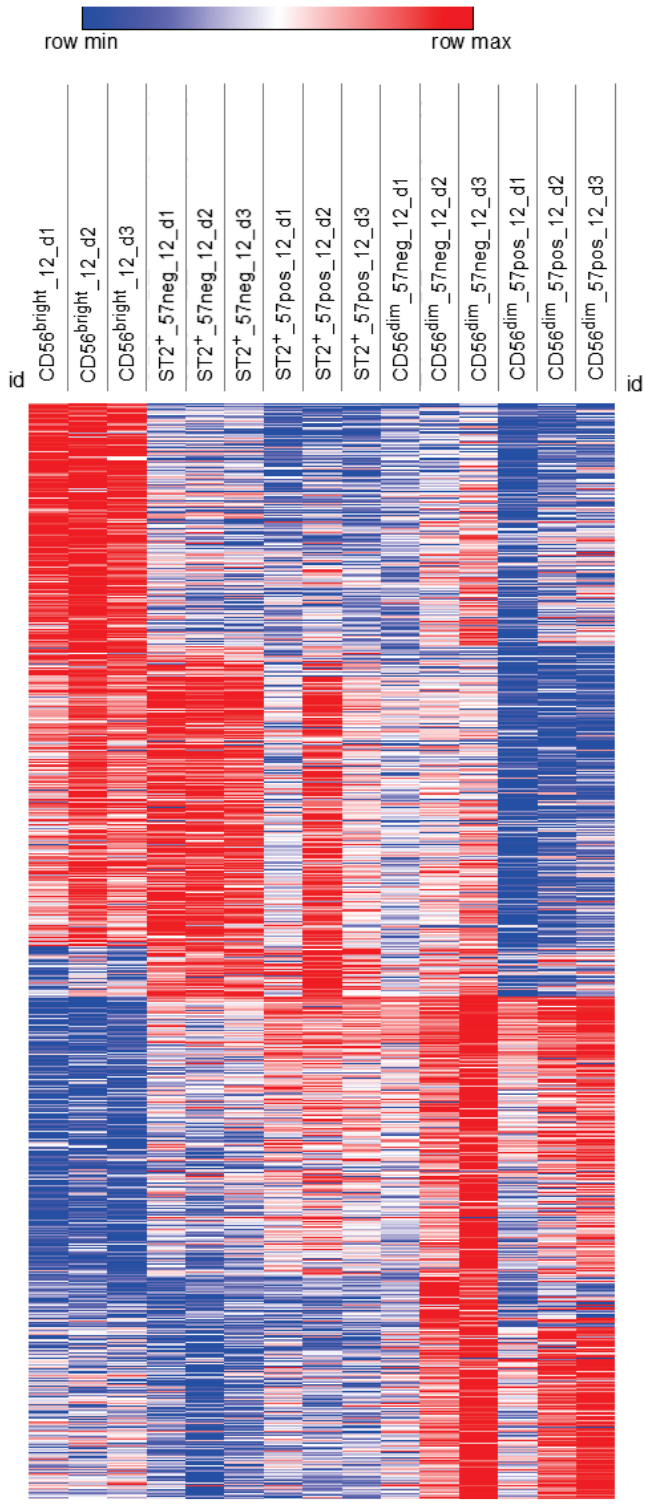
A-B/Plots are representative of at least three independent experiments.

A**B**

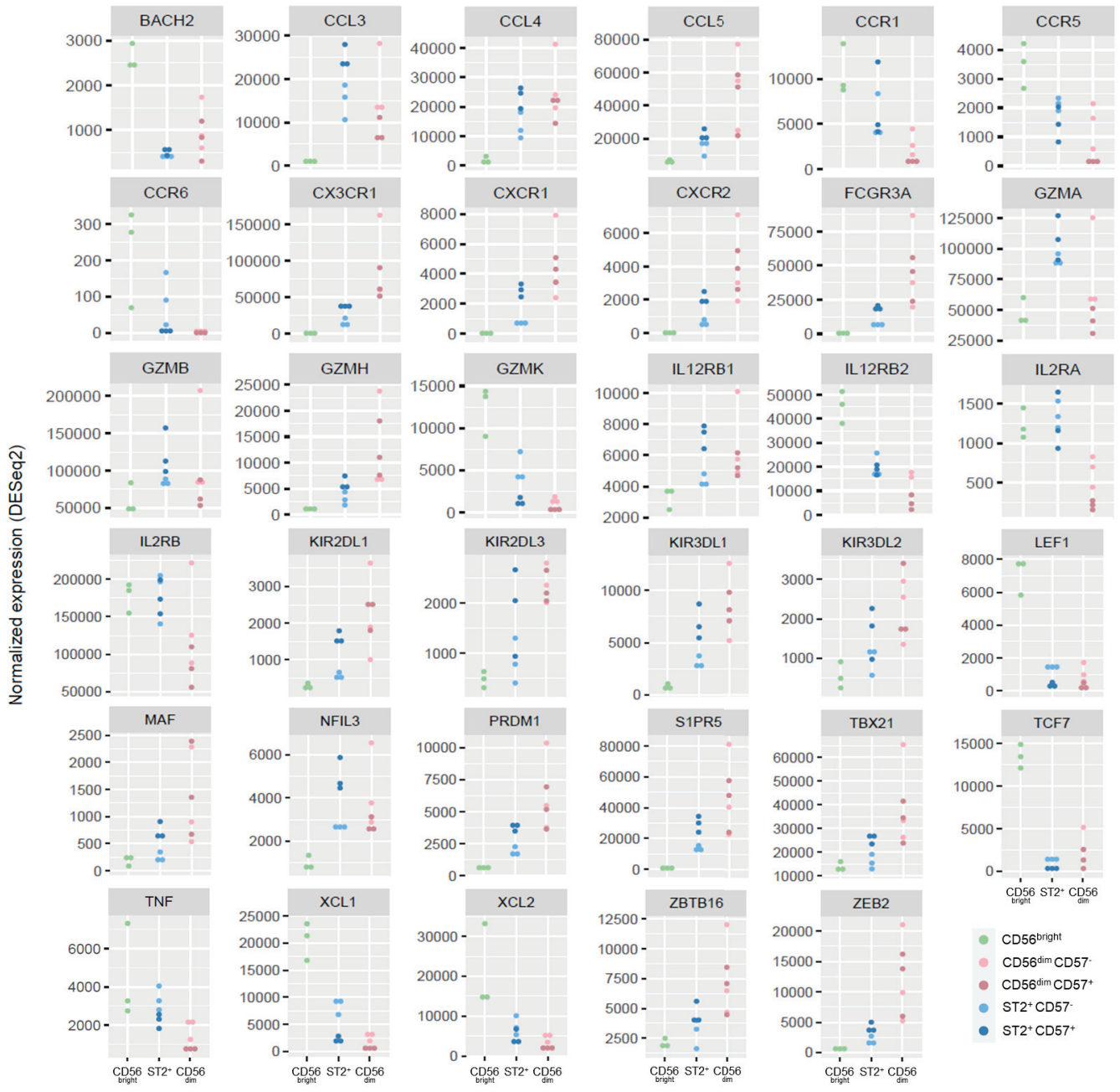
Group	Color code			
▲ Medium	CD56 ^{bright}	ST2 ⁺ CD57 ⁻	CD56 ^{dim} CD57 ⁻	CD56 ^{dim} CD57 ⁺
● IL-12		ST2 ⁺ CD57 ⁺		

C**D**

E



F



G



Figure 4. ST2⁺ NK cells display a unique gene signature compare to CD56^{bright} and CD56^{dim} NK cells

A/ Schematic representation of FACS sorting strategy to isolate eight different NK cell subsets, based on CD56, CD57 and ST2 surface expression defining ability (green) or incapacity (red) to respond to IL-33. Three subsets were obtained after 24h culture in medium and five subsets were obtained after culture in IL-12 (10 ng/ml) for 24hrs.

B/ Principal component analysis for eight FACS-sorted NK cells subsets based on expression of the top 500 most variant genes obtained from 3 independent healthy donors.

C/ Heatmap representing upregulated genes in each sorted NK cells subsets cultured in IL-12 compared to the two other subsets for 3 independent healthy donors. Squares identify specific transcriptional signatures for CD56^{bright} (green square), CD56^{dim} NK cells (pink square) and ST2⁺ NK cells (blue square).

D/ Normalized expression for top 10 genes most significantly upregulated in ST2⁺ NK cells compared to CD56^{bright} and CD56^{dim} NK cells.

E/ Heatmap representing relative expression for all differentially expressed genes (upregulated and downregulated) in each sorted NK cells subsets cultured in IL-12 compared to the two other subsets for 3 independent healthy donors.

F/ Normalized expression for selected genes involved in NK cell functions.

G/ ssGSEA analysis of the NK signatures composed of upregulated genes in each sorted NK cells subsets cultured in IL-12 compared to the two other subsets for 3 independent healthy donors.

A

GENE NAME	Log2FC	padj
IL23R	2,42	8,62E-19
TRPV1	1,54	1,46E-16
IL1RL1	2,61	5,21E-16
NDFIP2	1,96	4,35E-13
VEGFA	2,08	9,58E-12
DESI1	1,13	1,34E-11
FRMD4B	1,82	2,79E-11
DMRTA2	3,06	1,11E-10
FAM89A	1,19	1,82E-10
CDC7	1,07	6,82E-10
STRIP2	1,30	1,33E-09
NCS1	2,08	1,76E-09
SLC16A1	1,95	3,55E-09
CLU	1,90	7,36E-09
CHAC2	1,25	1,01E-08
ZNF367	1,89	1,18E-08
PSAT1	1,67	1,71E-08
GLB1L2	1,46	1,75E-08
WDR76	1,44	1,77E-08
CYC5	1,03	2,32E-08
ITGA3	1,30	2,39E-08
MT1X	1,31	2,55E-08
C4orf46	1,04	2,55E-08
CDKN2A	1,69	2,85E-08
WEE1	1,44	4,14E-08
FANCB	1,20	7,21E-08
ODC1	1,21	7,72E-08
PMAIP1	1,18	9,34E-08
MCM3	1,07	9,35E-08
LIMK2	1,16	9,50E-08
MCM5	1,20	9,66E-08
FANCC	1,17	1,07E-07
CTNNA1	1,80	1,11E-07
GIN54	1,74	1,34E-07
ANKRD9	1,19	1,37E-07
GZMA	1,08	1,46E-07
NMB	1,14	1,81E-07
TMEM106C	1,26	1,99E-07
MT1E	1,95	2,20E-07
CENPS-CORT	2,47	2,27E-07
PRXL2A	1,05	2,34E-07

MCM7	1,37	2,36E-07
CSTF2	1,09	2,78E-07
PACSIN3	2,26	4,00E-07
FAM222A	1,40	4,57E-07
AL121985.1	1,17	5,85E-07
MARCHF3	1,17	6,32E-07
TIMELESS	1,09	6,49E-07
AL354718.3	1,74	6,53E-07
ACTN1	1,75	6,79E-07
CCDC74A	1,32	6,80E-07
GIN53	1,34	6,94E-07
H4C2	1,95	7,43E-07
AL133215.2	1,42	1,01E-06
WDHD1	1,46	1,37E-06
PIIF	1,16	1,53E-06
TUBB	1,17	2,44E-06
PTGER3	1,95	2,74E-06
NUDT1	1,01	3,31E-06
CCDC167	1,07	3,82E-06
PGD	1,48	3,88E-06
AL645939.6	1,27	3,96E-06
RPP25	1,47	4,18E-06
HDAC9	1,48	4,27E-06
RPS6KL1	1,51	4,52E-06
C17orf58	1,01	4,54E-06
SLC43A3	1,14	5,04E-06
SNORD3A	1,13	5,06E-06
MTFP1	1,16	5,06E-06
ZNRF1	1,17	5,11E-06
PPFIA3	1,56	5,15E-06
UCK2	1,13	6,24E-06
AC011447.3	1,12	6,38E-06
HASPIN	1,69	6,61E-06
ULBP1	1,51	6,65E-06
SLC6A9	1,70	7,35E-06
RPA3	1,00	7,98E-06
ARHGAP11B	1,20	8,25E-06
CHAC1	1,24	9,02E-06
CDK4	1,12	9,71E-06
LRR1	1,00	9,74E-06
AP1S1	1,05	9,91E-06
SHMT2	1,20	1,06E-05
DNAIC9	1,22	1,10E-05

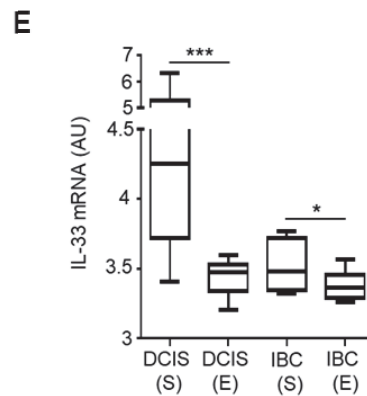
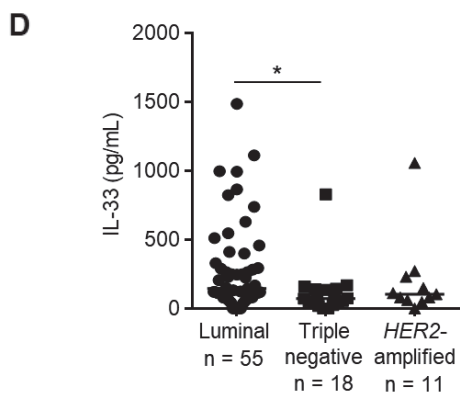
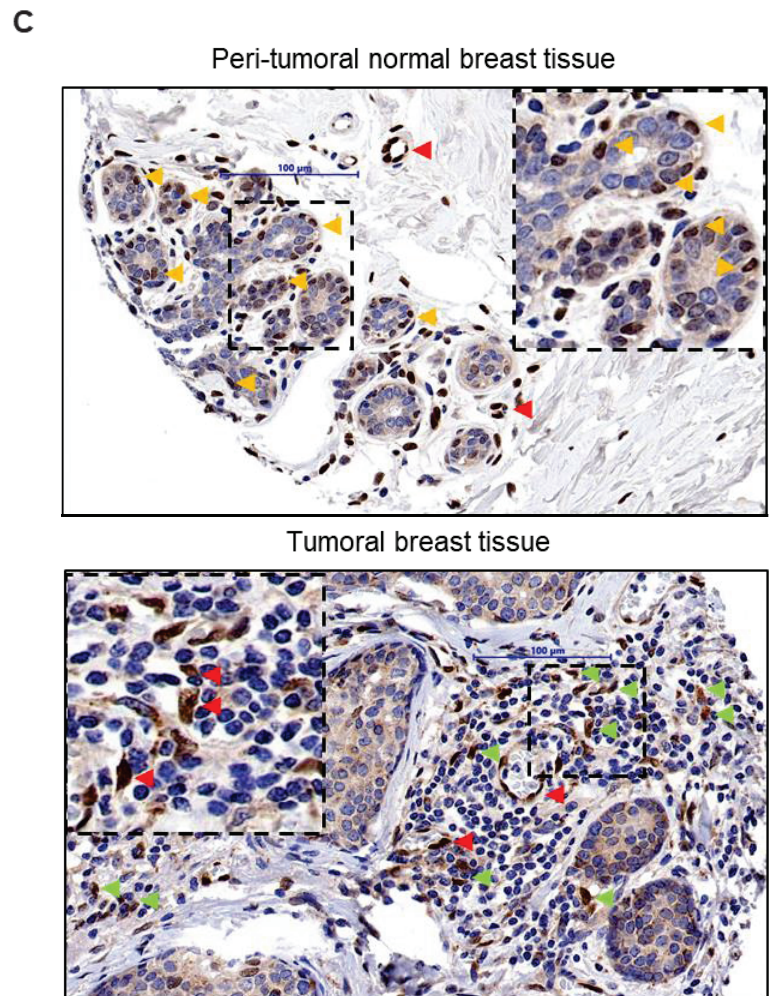
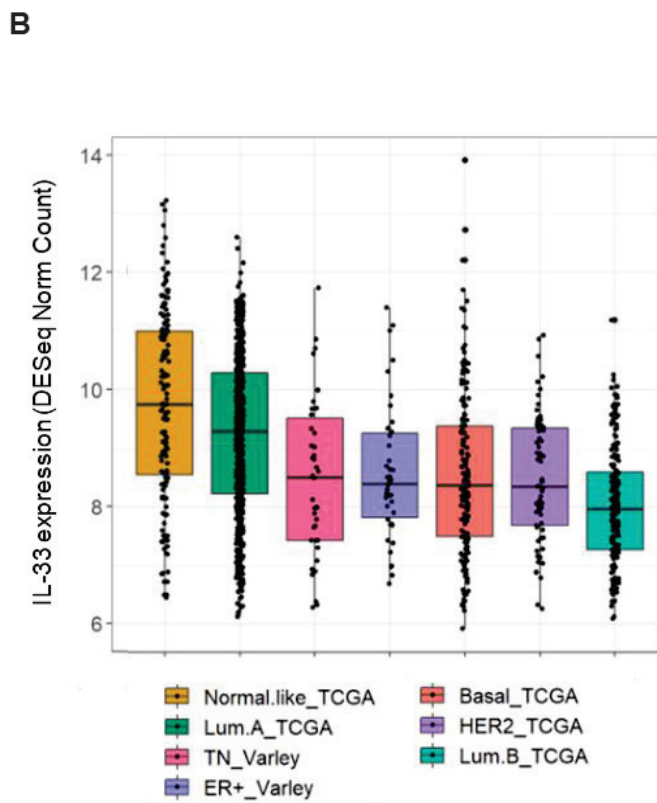
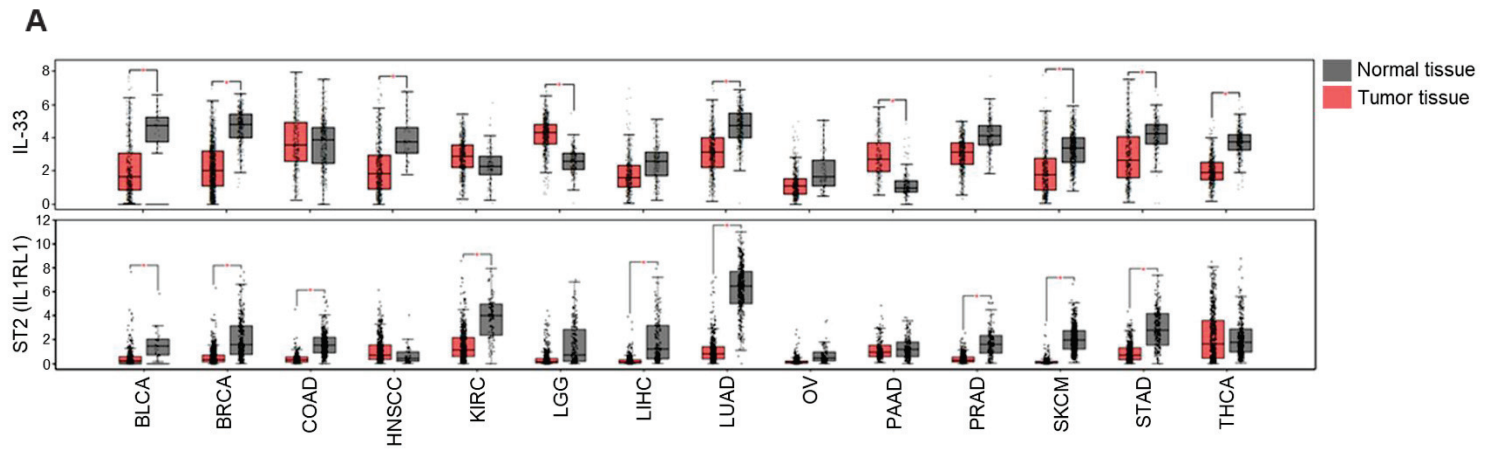
PSMC3IP	1,46	1,26E-05
GLP1R	1,50	1,44E-05
ICAM1	1,04	1,44E-05
TCF19	1,43	1,47E-05
CHPF	1,14	1,50E-05
UACA	1,29	1,82E-05
HPSE	1,25	1,95E-05
ZNF90	1,07	2,11E-05
CHD5	2,41	2,16E-05
STEAP1	1,83	2,20E-05
TMEM97	1,45	2,26E-05
PCNA	1,47	2,28E-05
DHCR7	1,02	2,35E-05
ATAD2	1,29	2,46E-05
CKS2	1,32	2,48E-05
DSN1	1,03	2,65E-05
POLD3	1,00	2,65E-05
PHLDA3	1,37	2,72E-05
AC079209.1	1,86	2,83E-05
CENPP	1,29	3,03E-05
PKM	1,13	3,19E-05
TESC	1,19	3,22E-05
MCM6	1,57	3,30E-05
MSH6	1,06	3,61E-05
RFC4	1,03	3,85E-05
CHAF1A	1,29	5,14E-05
H2AC13	1,05	5,37E-05
SPTY2D10S	1,29	5,43E-05
GPT2	1,48	5,78E-05
MCM4	1,63	5,91E-05
NDC80	1,29	6,10E-05
GMNN	1,44	6,13E-05
E2F2	1,66	6,41E-05
P2RX5-TAX1BP3	1,52	6,42E-05
PDLIM1	1,03	6,47E-05
TMEM154	1,01	6,83E-05
CHEK1	1,73	6,83E-05
TREML2	1,45	6,90E-05
EME1	1,57	7,31E-05
MCM2	1,61	7,37E-05
GIN52	1,85	7,53E-05
ORC6	1,58	7,53E-05

A
(Continued)

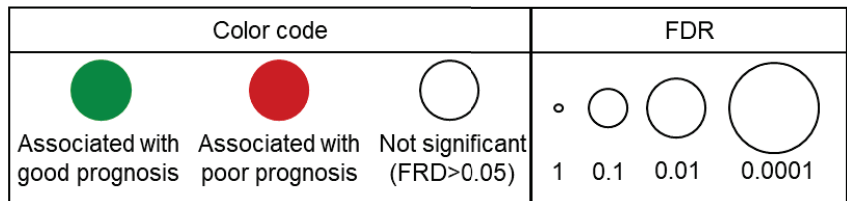
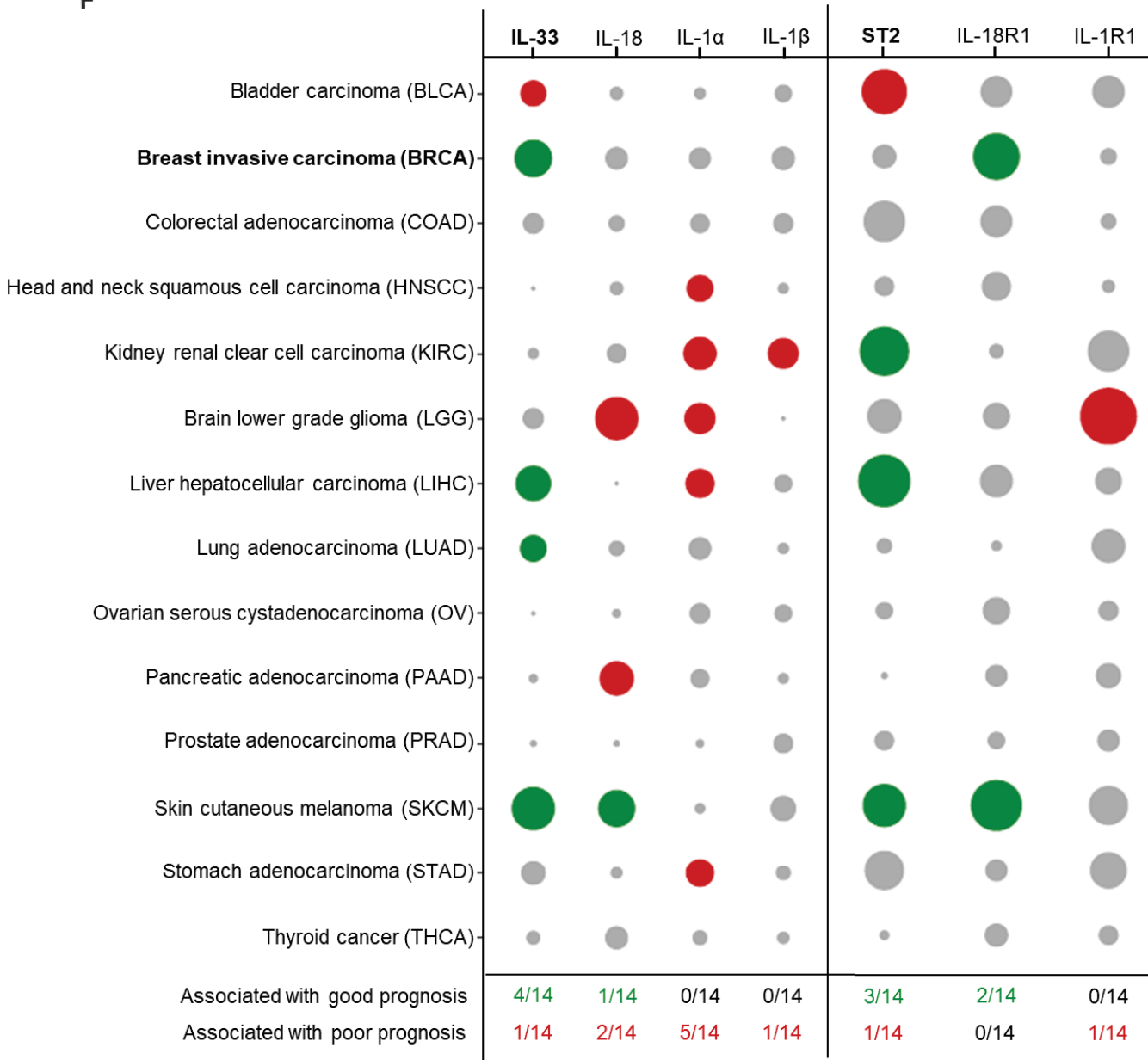
<i>EPOP</i>	1,32	7,69E-05
<i>POLD2</i>	1,12	7,83E-05
<i>TMPO-AS1</i>	1,72	8,18E-05
<i>IFNG</i>	1,46	8,47E-05
<i>RASD1</i>	1,56	8,58E-05
<i>DHCR24</i>	1,11	8,63E-05
<i>TFDP1</i>	1,30	8,77E-05
<i>AP153</i>	1,35	9,28E-05
<i>BRCA1</i>	1,40	9,45E-05
<i>SLC7A1</i>	1,11	9,65E-05
<i>DHFR</i>	1,56	0,00010235
<i>ATAD5</i>	1,11	0,00010269
<i>RANP1</i>	1,32	0,00011231
<i>BZW1P2</i>	1,12	0,00011231
<i>S100P</i>	1,83	0,00011298
<i>STAP2</i>	1,09	0,00011298
<i>FEN1</i>	1,39	0,00012315
<i>E2F1</i>	1,73	0,00012825
<i>AMOTL1</i>	1,03	0,00013064
<i>TUBAP2</i>	1,53	0,00013098
<i>DTYMK</i>	1,02	0,00013168
<i>NET1</i>	1,28	0,00013211
<i>CENPN</i>	1,54	0,00013737
<i>AC092718.4</i>	1,49	0,0001405
<i>LIP6</i>	1,93	0,00015449
<i>AC002116.2</i>	1,20	0,00016411
<i>UNG</i>	1,33	0,00016607
<i>RAD54B</i>	1,17	0,00017323
<i>ORC1</i>	1,67	0,0001824
<i>WDR62</i>	1,45	0,00018922
<i>CLSPN</i>	1,68	0,00019244
<i>SCD</i>	1,36	0,00019813
<i>WWC1</i>	1,85	0,00020148
<i>SOCS1</i>	1,17	0,00020477
<i>RNF157</i>	1,28	0,00021452
<i>TUBBP1</i>	1,51	0,00021481
<i>FANCI</i>	1,22	0,00021498
<i>AC125611.3</i>	1,09	0,00022702
<i>CHAF1B</i>	1,31	0,00023054
<i>BAG2</i>	1,05	0,00023727
<i>CENPH</i>	1,26	0,0002382
<i>DUT</i>	1,22	0,00024617
<i>EIF4EBP1</i>	1,21	0,00024939
<i>FOXRED2</i>	1,47	0,00025619
<i>ASRGL1</i>	1,16	0,00025747
<i>PIR</i>	1,65	0,00026824
<i>AL353135.2</i>	1,63	0,00027982
<i>ADM2</i>	1,01	0,0002927
<i>PSPH</i>	1,07	0,00030506
<i>GGH</i>	1,56	0,00031019
<i>LRP8</i>	1,11	0,00031513
<i>TLCD3A</i>	1,44	0,00031955
<i>SMTN</i>	1,13	0,00031955
<i>TUBA1B</i>	1,21	0,00032373
<i>KNTC1</i>	1,11	0,00032373
<i>KIF18A</i>	1,32	0,0003247
<i>AC004816.1</i>	1,66	0,0003456
<i>MASTL</i>	1,02	0,00036448
<i>DTL</i>	1,63	0,00044953
<i>POLE2</i>	1,53	0,00044998
<i>TUBG1</i>	1,02	0,00045177
<i>FAM72A</i>	1,15	0,00045593
<i>TEDC2</i>	1,65	0,00045766
<i>P2RX5</i>	1,50	0,00045823
<i>ARHGAP11A</i>	1,25	0,00046369
<i>CDC25A</i>	1,82	0,00048693
<i>EXO1</i>	1,69	0,00049185
<i>TUBA1C</i>	1,10	0,0005068
<i>B4GALNT1</i>	2,16	0,00052029
<i>CCDC74B</i>	1,12	0,00052045
<i>EZH2</i>	1,01	0,00054938
<i>AC007952.4</i>	1,16	0,00055426
<i>DCTPP1</i>	1,12	0,00055819
<i>WARS1</i>	1,08	0,00056313
<i>BRI3BP</i>	1,05	0,00059269
<i>CDC6</i>	1,64	0,00060609
<i>HMGA1</i>	1,25	0,00062962
<i>RFC3</i>	1,30	0,00063763
<i>CKS1B</i>	1,22	0,00064432
<i>HELLS</i>	1,54	0,00066022
<i>TCAM1P</i>	1,02	0,00066435
<i>EDA2R</i>	1,83	0,00069177
<i>HMGB2</i>	1,01	0,00069702
<i>CDT1</i>	1,62	0,00075425
<i>FZD5</i>	1,30	0,00075425
<i>CENPU</i>	1,51	0,00080079
<i>RAD51AP1</i>	1,43	0,00080124
<i>PAQR4</i>	1,36	0,00080489
<i>HDC</i>	2,33	0,0008096
<i>POLR3G</i>	1,33	0,00081112
<i>XRCC2</i>	1,41	0,0008401
<i>UBE2T</i>	1,50	0,00085717
<i>AC011511.5</i>	1,30	0,00085717
<i>DONSON</i>	1,10	0,00085717
<i>CDKN1A</i>	1,58	0,00085756
<i>MTFR2</i>	1,40	0,00085995
<i>ELFN1-AS1</i>	1,68	0,00089647
<i>PHGDH</i>	1,46	0,00089916
<i>THSD8</i>	1,19	0,0009004
<i>STIL</i>	1,43	0,00090731
<i>ATF3</i>	1,09	0,00092945
<i>ERCC6L</i>	1,45	0,00092992
<i>TTK</i>	1,58	0,00093175
<i>SLC35G1</i>	1,16	0,00093185
<i>TIPIN</i>	1,15	0,00097923
<i>RAB3D</i>	1,01	0,00098867
<i>HSF5</i>	1,25	0,00099502

Supplementary Figure S4. ST2⁺ NK cells display a unique gene signature compare to CD56^{bright} and CD56^{dim} NK cells

Log2 foldchange and adjusted p-value associated with all 234 genes upregulated in ST2⁺ NK cells compare to CD56^{bright} and CD56^{dim} NK cells.



F



G

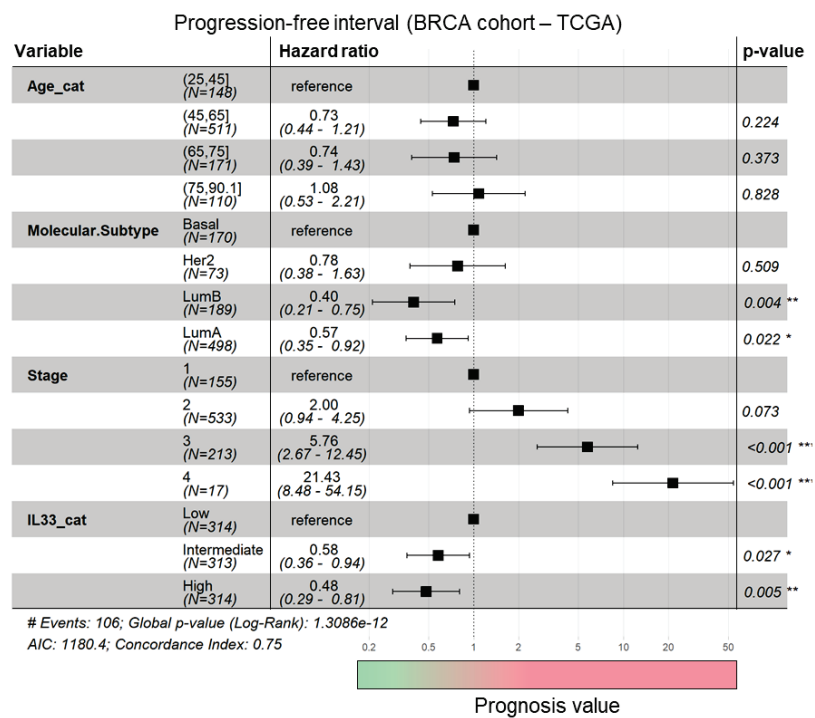


Figure 5. IL-33 is expressed in breast tumors and associated with increased overall survival in several cancers in patients

A/ *IL33* and *ST2* gene expression (log2 TPM +1) in normal (grey) and tumoral tissue (orange) extracted from TCGA database (BLCA : Bladder carcinoma; BRCA : Breast invasive carcinoma; COAD : Colorectal adenocarcinoma; HNSCC : Head and neck squamous cell carcinoma; KIRC : Kidney renal clear cell carcinoma; LGG : Brain lower grade glioma; LIHC: Liver hepatocellular carcinoma; LUAD : Lung adenocarcinoma; OV : Ovarian serous cystadenocarcinoma; PAAD : Pancreatic adenocarcinoma; SKCM : Skin cutaneous melanoma; STAD : Stomach adenocarcinoma; THCA : Thyroid cancer).

B/ *IL33* gene expression (normalized counts) in different breast cancer molecular subtypes was extracted from TCGA database (LumA : Luminal A; TN: Triple negative; Basal : Basal-like; LumB : Luminal B).

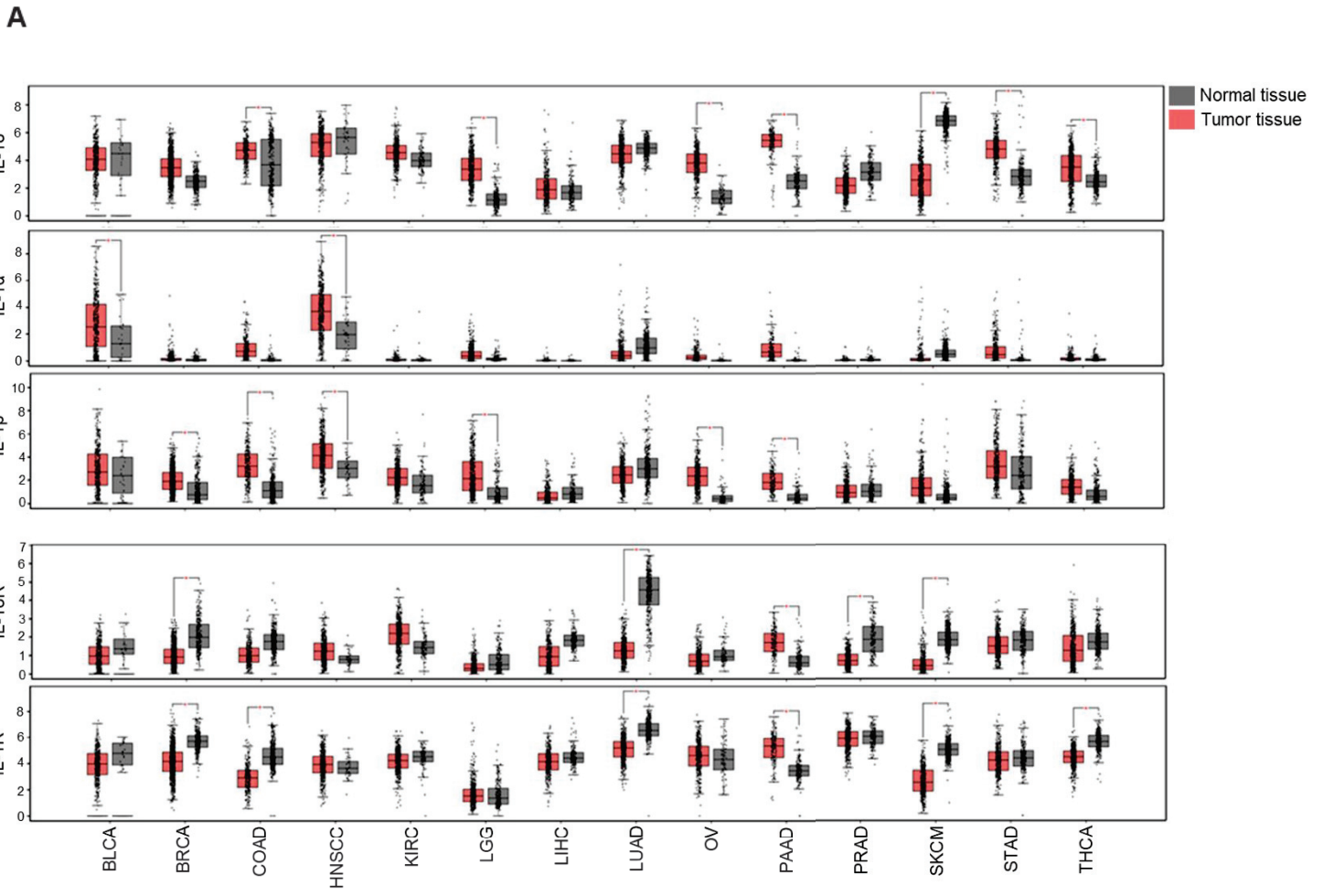
C/ IL-33 protein was quantified by Luminex assay in breast tumor-derived supernatants (n=89). Kruskal-Wallis test followed by Dunn multiple comparisons test were performed.

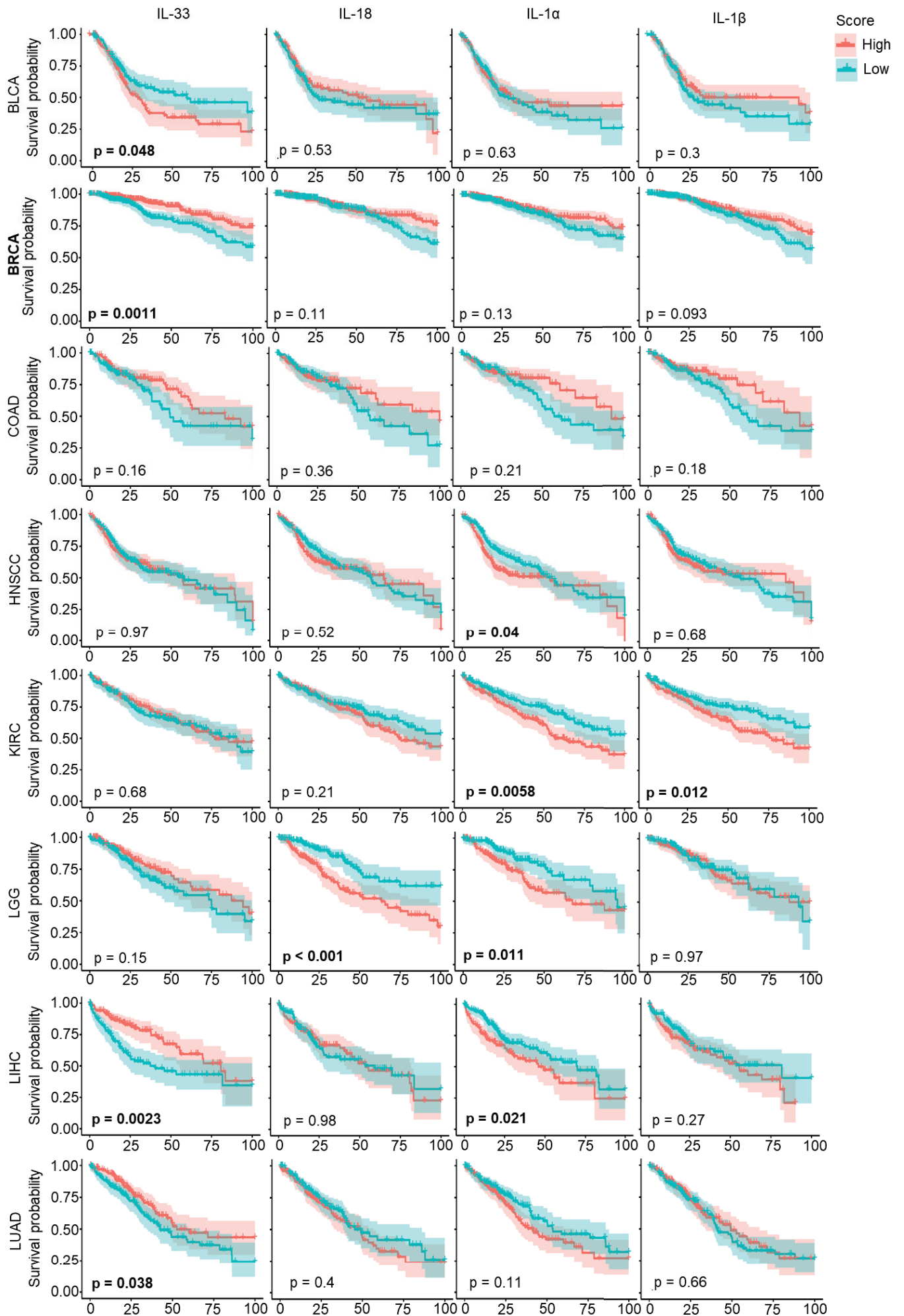
D/ IL-33 expression was analyzed on breast tumors TMA by Immuno-Histo Chemistry (IHC). Non-invasive Ductal Carcinoma *In Situ* (DCIS) and invasive Breast Cancer (IBC) lesions were identified based on anatomopathological tissue observations. Red arrows indicate blood vessels, orange arrows indicate peritumoral normal breast acini and green arrows indicate isolated stromal cells positive for IL-33 staining. Images are shown at 20x magnification. Dotted squares show areas chosen for zoom images.

E/ Transcriptomic data obtained by laser microdissection of stromal versus epithelial zones from DCIS or IBC lesions were extracted from [Lee et al., 2012](#) to analyze *IL33* gene expression. Kruskal-Wallis test followed by Dunn multiple comparisons test were performed.

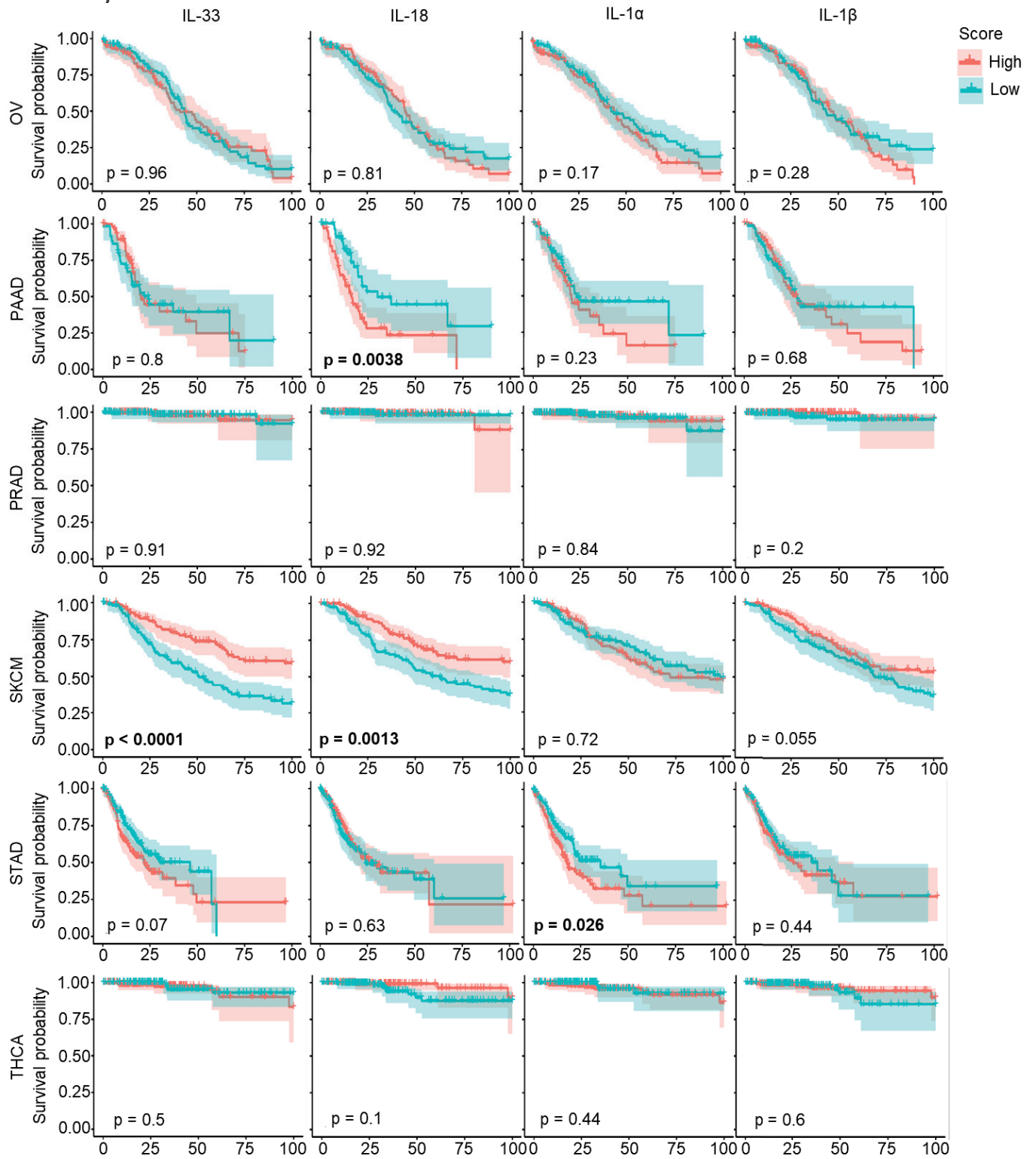
F/ Summary of p-values associated with the log rank test performed to evaluate prognostic value of each IL-1 cytokine family and their receptors in 14 human TCGA cancer data sets. Data are represented as a bubble map showing positive (green) or negative (red) impact on overall survival. Dots size represents p-values obtained by log-rank test.

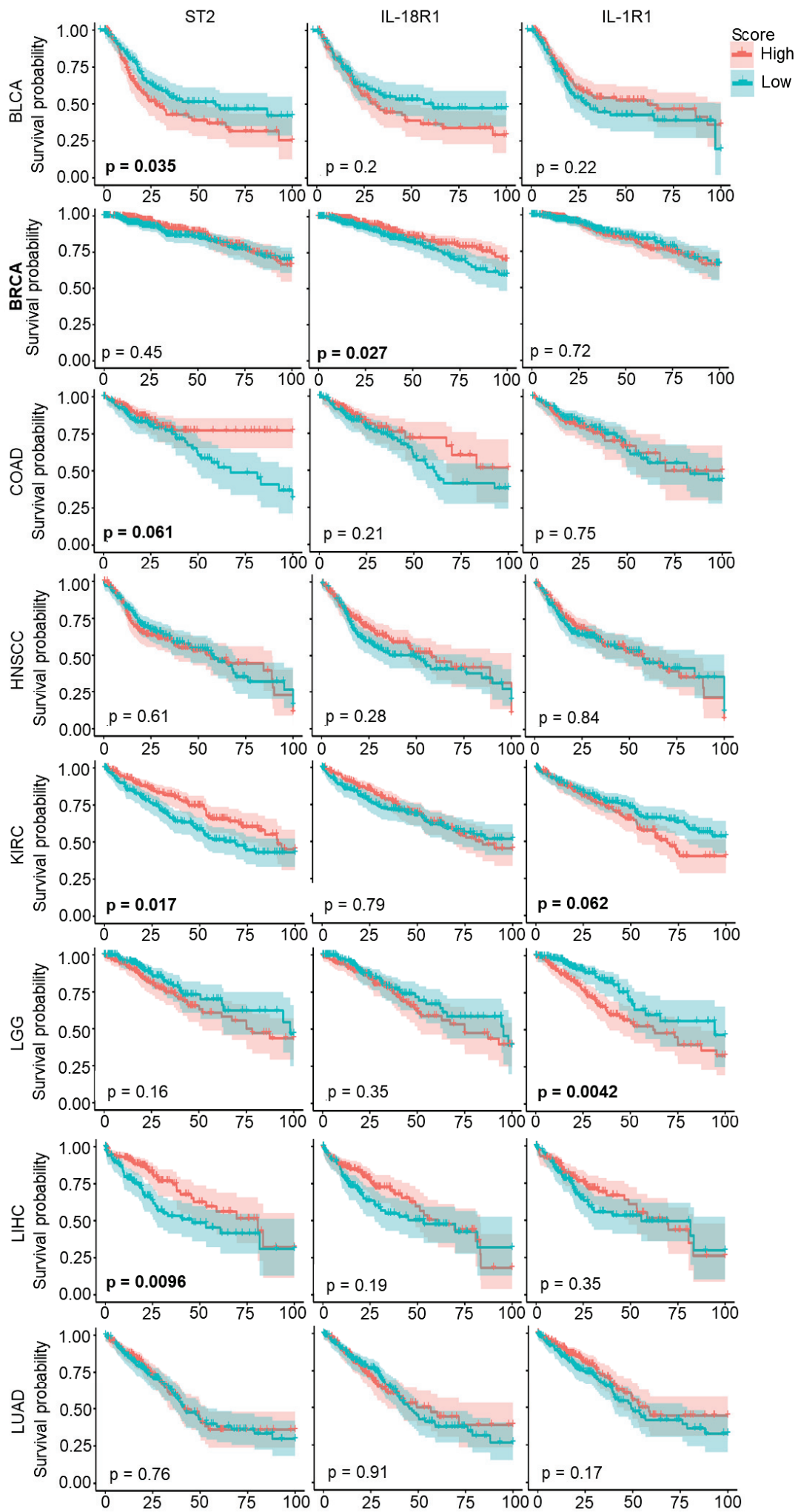
G/ Multivariate Cox analysis of IL-33 impact on prognosis in breast cancers from TCGA dataset regarding the age, molecular subtype, and stage of the tumors p-values were obtained with log-rank test.



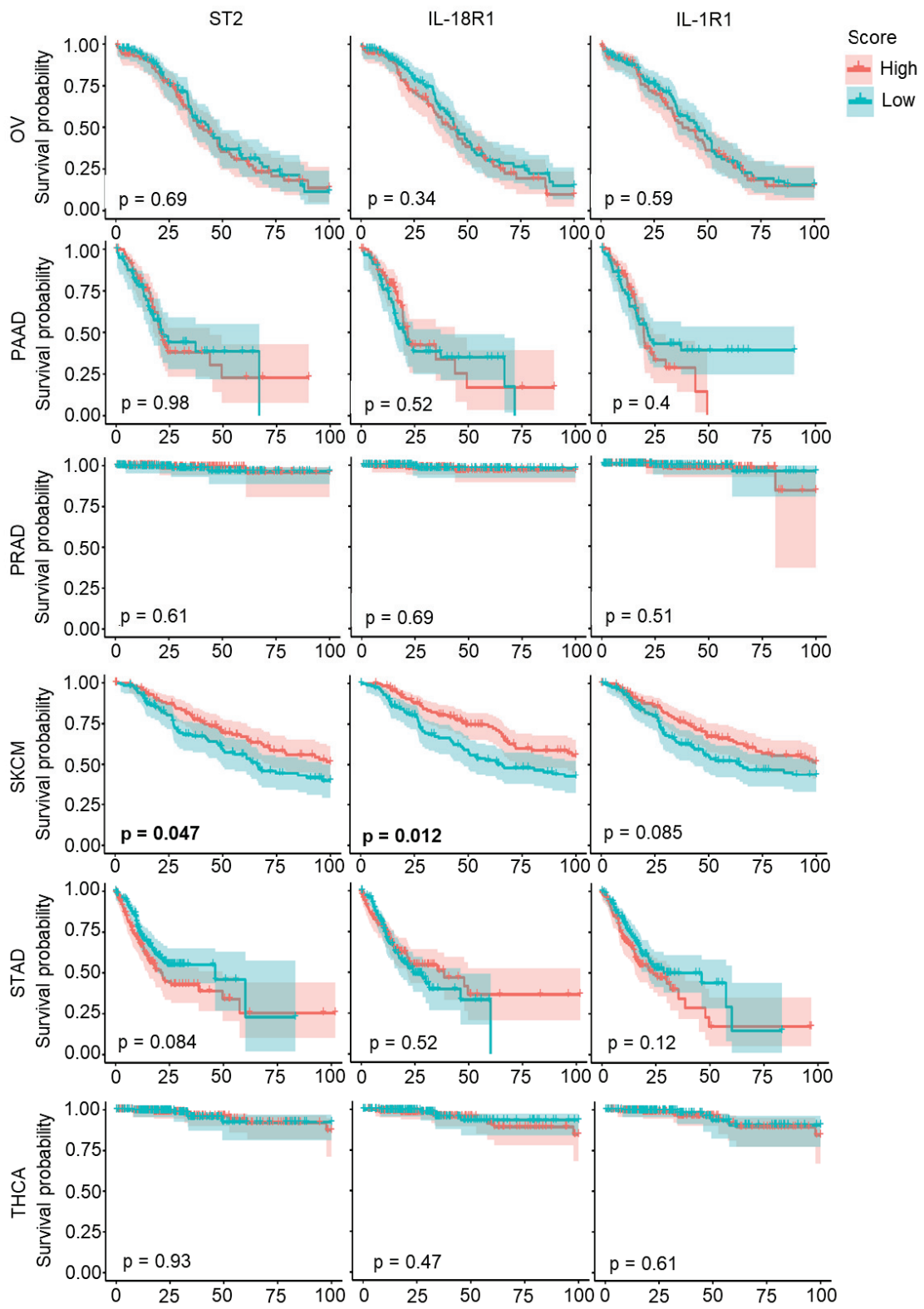
B

B
(Continued)



C

C
(Continued)



Supplementary Figure S5. IL-33 is associated with increased overall survival in several cancers

A/ *IL18*, *IL1A*, *IL1B*, *IL18R1*, and *IL1R1* gene expression (\log_2 TPM +1) in normal (grey) and tumoral tissue (orange) was extracted from TCGA database (BLCA : Bladder carcinoma; BRCA : Breast invasive carcinoma; COAD : Colorectal adenocarcinoma; HNSCC : Head and neck squamous cell carcinoma; KIRC : Kidney renal clear cell carcinoma; LGG : Brain lower grade glioma; LIHC: Liver hepatocellular carcinoma; LUAD : Lung adenocarcinoma; OV : Ovarian serous cystadenocarcinoma; PAAD : Pancreatic adenocarcinoma; SKCM : Skin cutaneous melanoma; STAD : Stomach adenocarcinoma; THCA : Thyroid cancer).

B/ Patients from TCGA database were stratified as high or low for *IL33*, *IL18*, *IL1A* and *IL1B* and survival was analyzed in all cancers data sets. Kaplan-Meier survival curves for breast cancer patients are represented and p-values were obtained with log-rank test.

C/ Patients from TCGA database were stratified as high or low for *ST2*, *IL18R1* and *IL1R1* and survival was analyzed in all cancers data sets. Kaplan-Meier survival curves for breast cancer patients are represented and p-values were obtained with log-rank test.

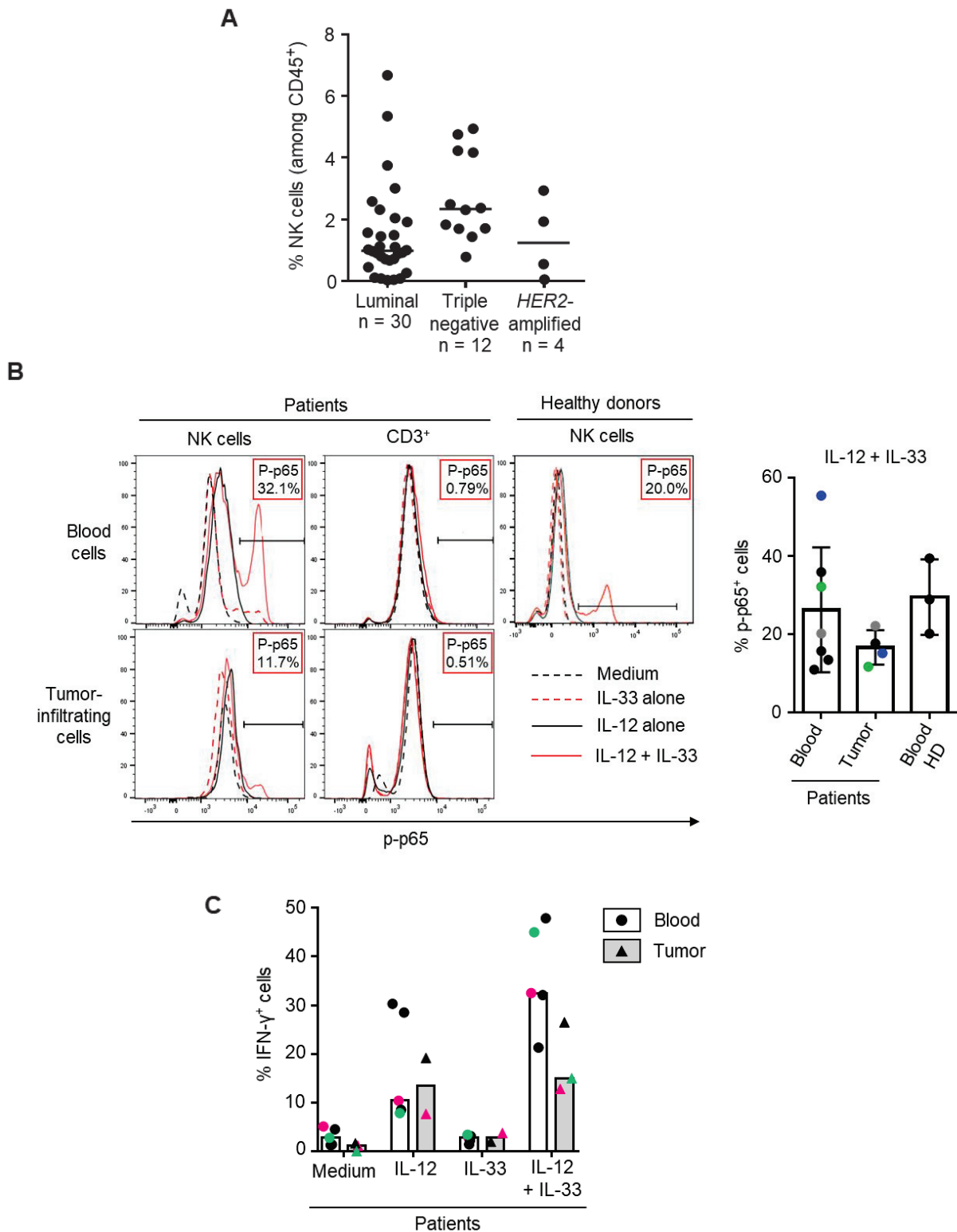
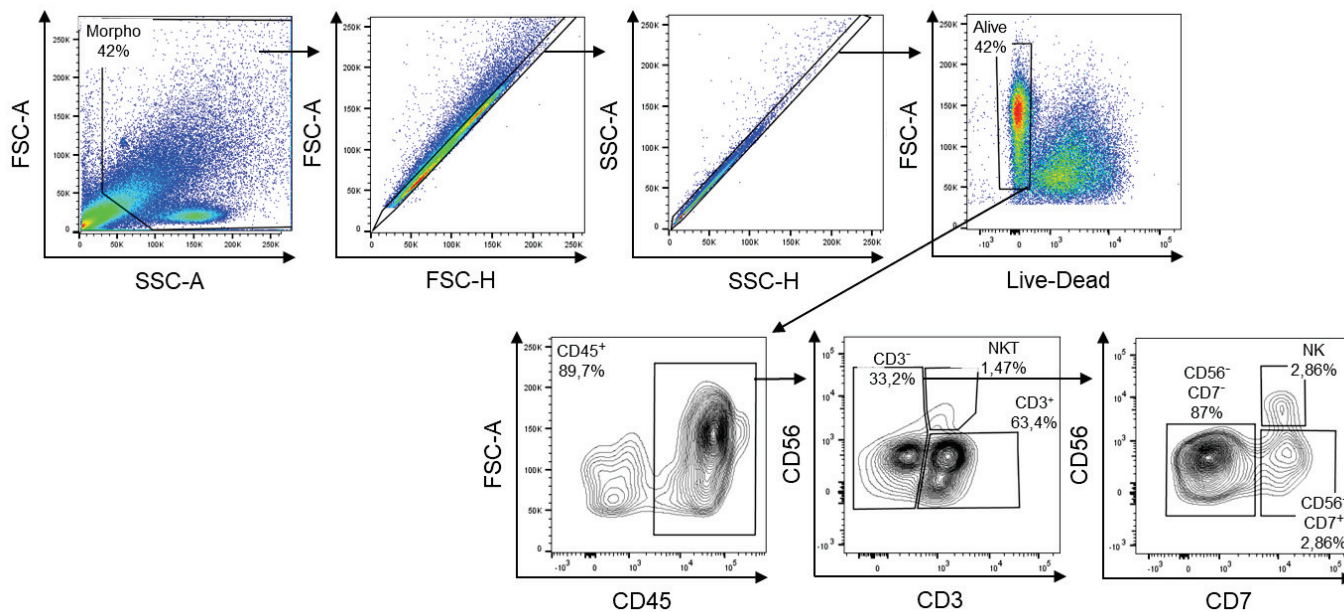


Figure 6. Peripheral and tumor-infiltrating NK cells from breast cancer patients respond to IL-33 and IL-12 combination

A/ Cell suspensions were obtained from fresh breast tumors to analyze NK cell frequency among total infiltrating cells by flow cytometry (n=46 patients).

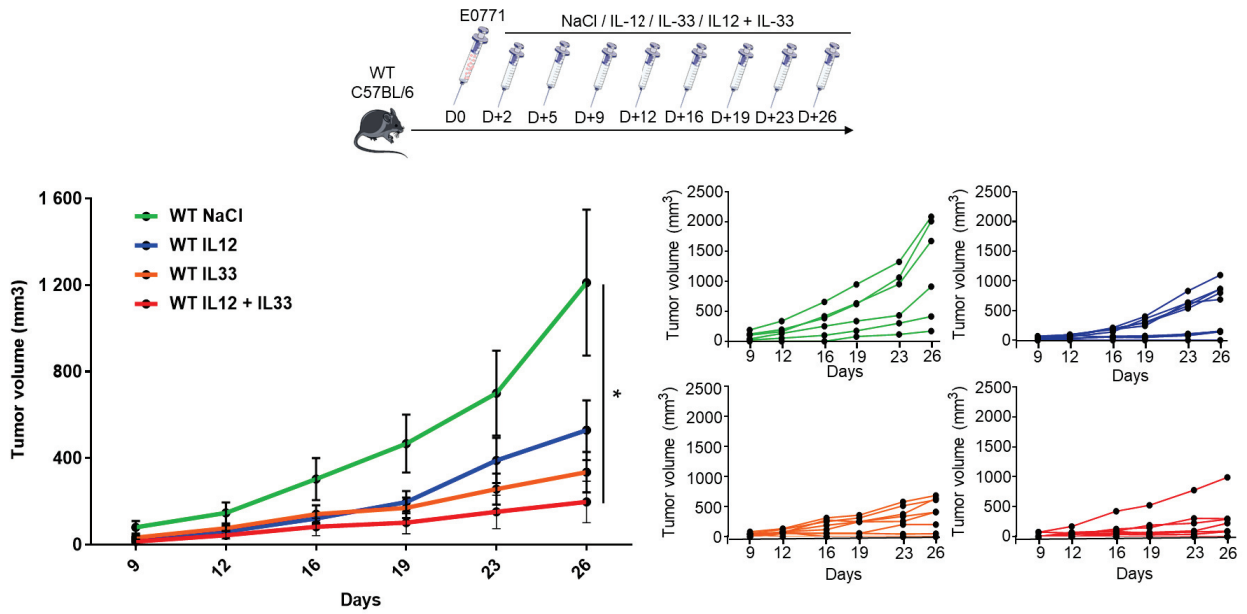
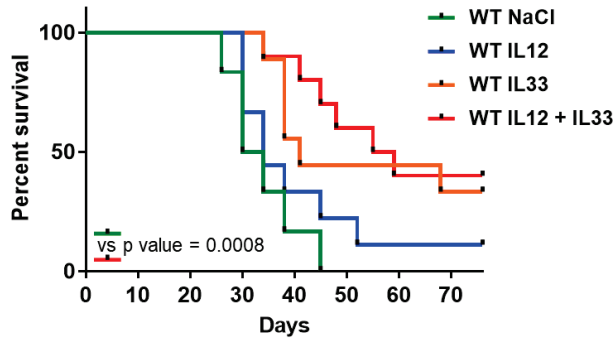
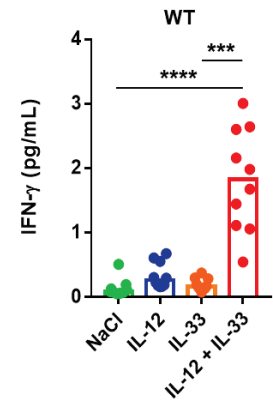
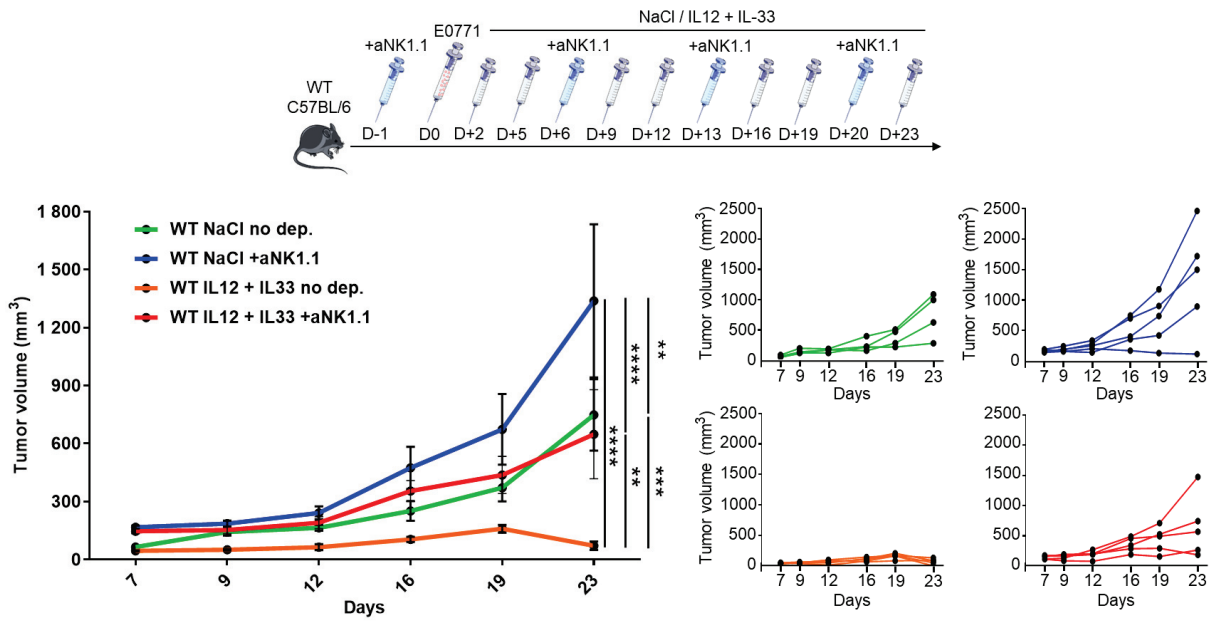
B/ Cell suspensions from fresh tumors and PBMCs from BC patients or healthy donors were activated with medium (dotted black line) or IL-12 alone (solid black line) for 24hrs prior to IL-33 addition supplemented (solid red line) or not (dotted red line) with IL-12. p65 phosphorylation was analyzed 5min after IL-33 addition by flow cytometry. Representative histogram plots (left) and quantification (%) (right) of p-p65⁺ NK cells after IL-12 and IL-33 combination. Kruskal-Wallis test followed by Dunn multiple comparisons test were performed with no statistically significant differences.

C/ Cell suspensions from fresh tumors and PBMCs from BC patients were activated with medium, or IL-12 and IL-33 in combination (10ng/mL each cytokines) for 24hrs. Intracellular IFN- γ expression was analyzed by flow cytometry. Kruskal-Wallis test followed by Dunn multiple comparisons test were performed with no statistically significant differences.

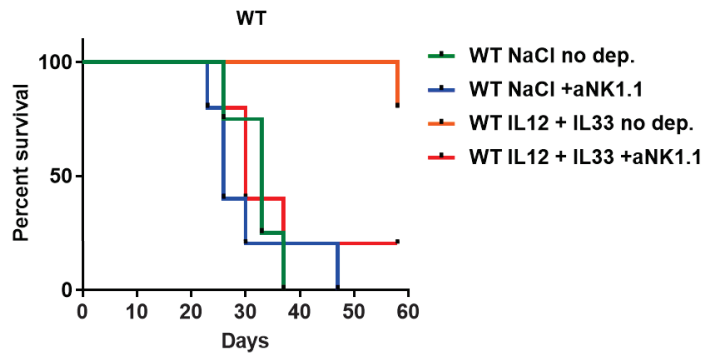


Supplementary Figure S6. Gating strategy to identify NK cells in tumor cell suspensions by flow cytometry

Tumor cell suspensions were stained for CD45, CD3, CD56 and CD7 expression and tumor-infiltrating NK cells were identified using gating strategy as illustrated. Cell viability was determined using Zombie dye (Biolegend).

A**B****C****D**

E



F

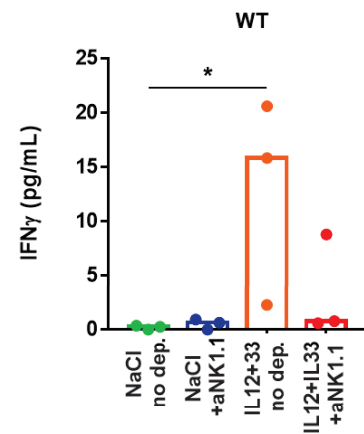


Figure 7. IL-33 and IL-12 combination promotes antitumor functions in a NK-cell-dependent mechanism

A/ WT mice were injected intra-mammary with 2.5×10^5 E0771 cells on day 0 and then treated in tumor area with 10ng/mouse rmIL-12 or 100ng/mouse rmIL-33 alone or the two cytokines combined twice a week from day 2 to day 26. Primary tumor growth was monitored in mice treated with NaCl solution (n=6, green curves), IL-12 alone (n=9, blue curves), IL-33 alone (n=9, orange curves) or the two cytokines in combination (n=10, red curves). Two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test were performed.

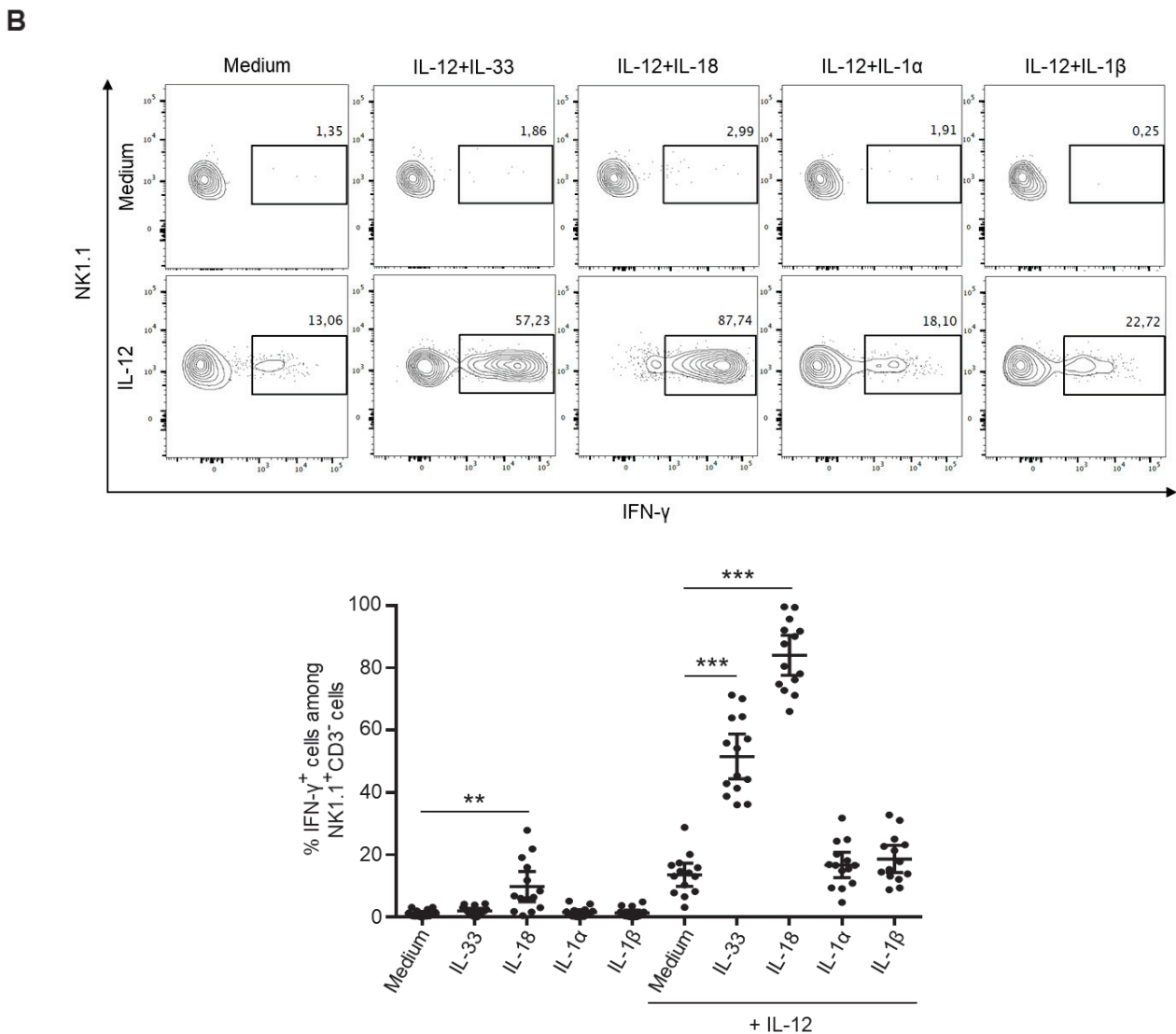
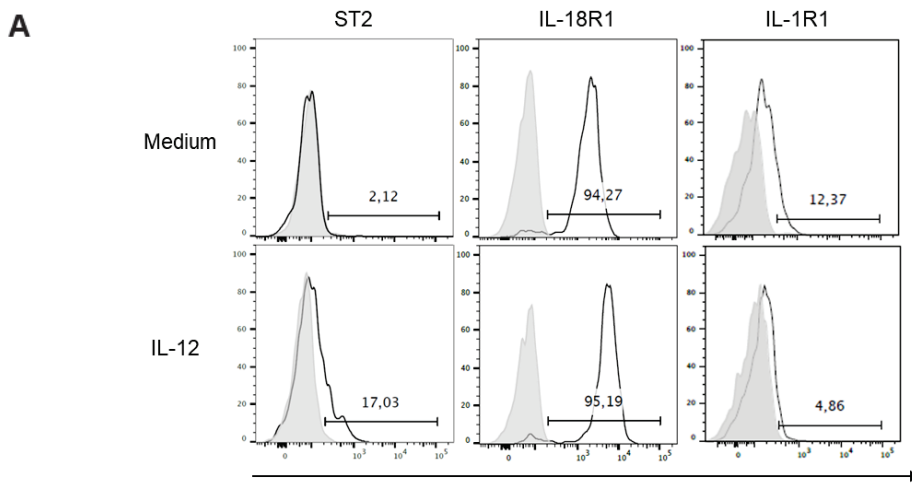
B/ Kaplan-Meier survival plots of WT mice treated with NaCl (n=6, green curve), IL-12 alone (n=9, blue curve), IL-33 alone (n=9, orange curve) or the two cytokines in combination (n=10, red curve). Mice were sacrificed when longest side of primary tumor reached 17mm. Log-rank test was performed and p-value is indicated for NaCl vs IL-12 + IL-33 comparison.

C/ Serum was retrieved from blood collected at day 5, 4hrs after NaCl or cytokine injections in peritumoral area. IFN- γ concentration was measured by Elisa in the serum of mice treated with NaCl (n=6, green dots), IL-12 alone (n=9, blue dots), IL-33 alone (n=9, orange dots) or the two cytokines in combination (n=10, red dots). Kruskal-Wallis test followed by Dunn multiple comparisons test were performed.

D/ WT mice were injected intra-peritoneally with NaCl or 200ug/mice of anti-NK1.1 depleting antibody prior to intra-mammary injection with 2.5×10^5 E0771 cells on day 0 and then treated in tumor area with NaCl or 10ng/mouse rmIL-12 and 100ng/mouse rmIL-33 combination twice a week from day 2 to day 23. Primary tumor growth was monitored in non-depleted WT mice treated with NaCl (n=4, green curves) or with IL-12 and IL-33 combination (n=5, orange curves) or in NK cells-depleted WT mice treated with NaCl (n=5, blue curves) or with IL-12 and IL-33 combination (n=5, red curves). Two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test were performed.

E/ Kaplan-Meier survival plots of non-depleted WT mice treated with NaCl (n=4, green curves) or with IL-12 and IL-33 combination (n=5, orange curves) or in NK cells-depleted WT mice treated with NaCl (n=5, blue curves) or with IL-12 and IL-33 combination (n=5, red curves). Mice were sacrificed when longest side of primary tumor reached 17mm. Log-rank test was performed and p-value is indicated for non-depleted mice treated with IL-12 + IL-33 vs NK cell-depleted mice treated with IL-12 + IL-33.

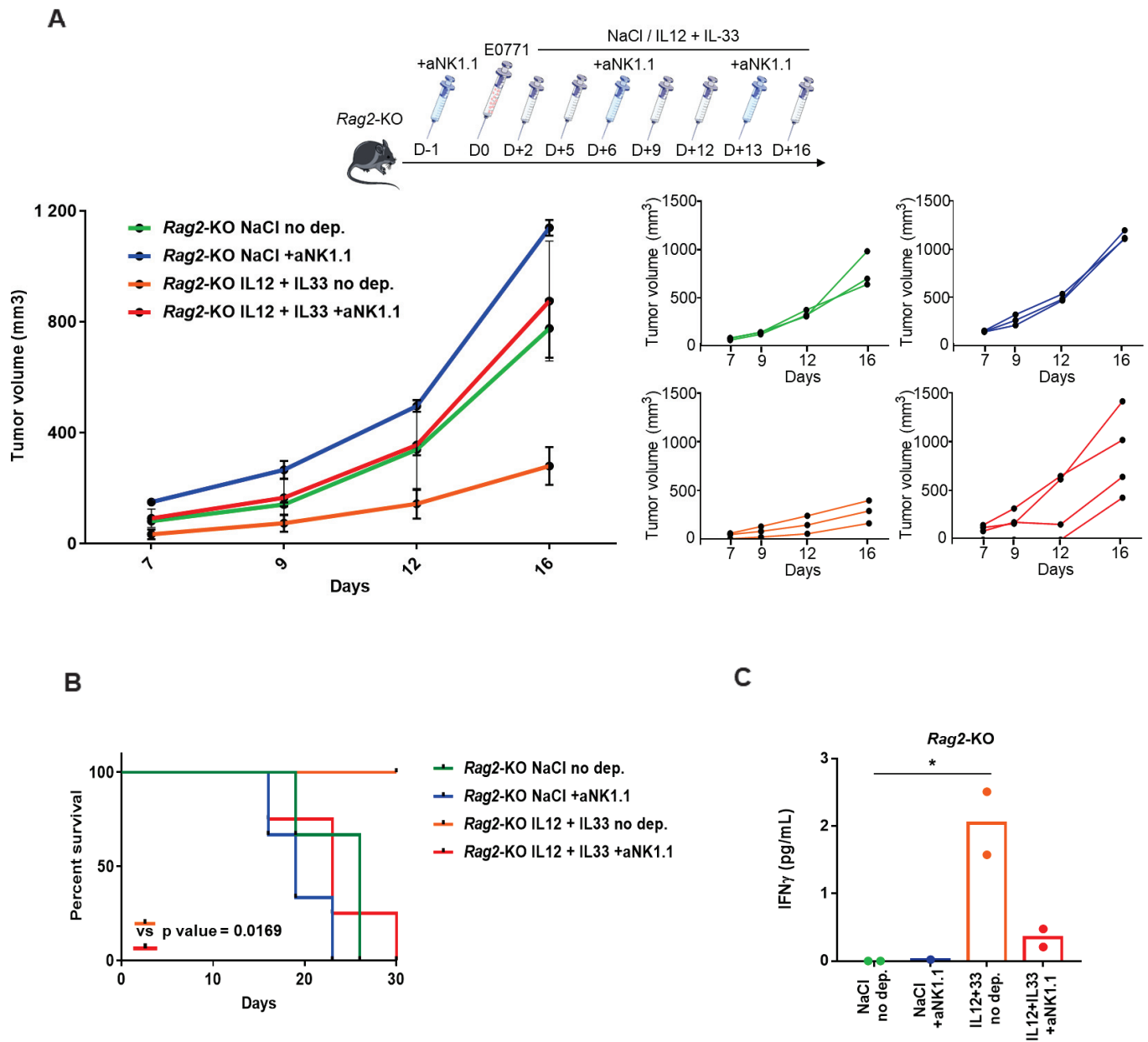
F/ Serum was retrieved from blood collected at day 5, 4hrs after NaCl or cytokine injections in peritumoral area. IFN- γ concentration was measured by ELISA in the serum of non-depleted WT mice treated with NaCl (n=4, green dots) or with IL-12 and IL-33 combination (n=5, orange dots) or in NK cells-depleted WT mice treated with NaCl (n=5, blue dots) or with IL-12 and IL-33 combination (n=5, red dots). Kruskal-Wallis test followed by Dunn multiple comparisons test were performed.



Supplementary Figure S7. IL-12 sensitizes mouse splenic NK cells to produce IFN- γ in response to IL-12 and IL-33 combination

A/ Splenic cells were activated with IL-12 (20ng/mL) or not for 24hrs and stained for CD45, NK1.1 and CD3 surface expression to identify NK cells. ST2, IL-18R1, and IL-1R1 (black line) or corresponding isotypic control (grey) surface expression on NK cells was analyzed by flow cytometry. Plots are representative of three independent experiments.

B/ Splenic cells were activated as indicated (20ng/ml each cytokines) for 24hrs and stained for CD45, NK1.1 and CD3 surface expression to identify NK cells. IFN- γ intracellular expression was analyzed in NK cells by flow cytometry. Plots are representative of four independent experiments with 3 to 4 mice/experiment and results for single mice are presented below. Two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test were performed.



Supplementary Figure S8. Anti-tumoral effect of IL-33 and IL-12 combination is dependent on NK cells in *Rag2*-KO mice

A/ *Rag2*-KO mice were injected intra-peritoneally with NaCl or 200ug/mice of anti-NK1.1 depleting antibody prior to intra-mammary injection with 2.5×10^5 E0771 cells on day 0 and then treated in tumor area with NaCl or 10ng/mouse rIL-12 and 100ng/mouse rIL-33 combination twice a week from day 2 to day 23. Primary tumor growth was monitored in non-depleted *Rag2*-KO mice treated with NaCl (n=3, green curves) or with IL-12 and IL-33 combination (n=3, orange curves) or in NK cells-depleted WT mice treated with NaCl (n=3, blue curves) or with IL-12 and IL-33 combination (n=4, red curves). Two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test were performed.

B/ Kaplan-Meier survival plots of non-depleted *Rag2*-KO mice treated with NaCl (n=3, green curves) or with IL-12 and IL-33 combination (n=3, orange curves) or in NK cells-depleted WT mice treated with NaCl (n=3, blue curves) or with IL-12 and IL-33 combination (n=4, red curves). Mice were sacrificed when longest side of primary tumor reached 17mm. Log-rank test was performed and p-value is indicated for non-depleted mice treated with IL-12 + IL-33 vs NK cell-depleted mice treated with IL-12 + IL-33.

C/ Serum was retrieved from blood collected at day 5, 4hrs after NaCl or cytokine injections in peritumoral area. IFN- γ concentration was measured by Elisa in the serum of non-depleted *Rag2*-KO mice treated with NaCl (n=3, green dots) or with IL-12 and IL-33 combination (n=3, orange dots) or in NK cell-depleted WT mice treated with NaCl (n=3, blue dots) or with IL-12 and IL-33 combination (n=4, red dots). Kruskal-Wallis test followed by Dunn multiple comparisons test were performed.

Table 1. Reagents and resources

Reagent or resource	Source	Reference or accession number
Flow cytometry antibodies (Human)		
Anti-CD3-BV711	BD Bioscience	Clone UCHT1 Mouse IgG1 κ
Anti-CD3-PerCP	Miltenyi	Clone BW264/56, Mouse IgG2a κ
Anti-CD3-V450	BD Bioscience	Clone UCHT1 Mouse IgG1 κ
Anti-CD4-BB515	BD Bioscience	Clone RPAT4 Mouse IgG1 κ
Anti-CD4-FITC	BD Bioscience	Clone RPAT4 Mouse IgG1 κ
Anti-CD7-BV650	BD Bioscience	Clone M-T701, Mouse IgG1 κ
Anti-CD7-BV711	BD Bioscience	Clone M-T701, Mouse IgG1 κ
Anti-CD7-FITC	Beckman Coulter	Clone 8h8.1, Mouse IgG2a κ
Anti-CD8-PerCP-Cy5.5	BD Bioscience	Clone RPA T8, Mouse IgG1 κ
Anti-CD14-BV510	BD Bioscience	Clone MφP9, Mouse IgG2b κ
Anti-CD16-V500	BD Bioscience	Clone 3G8, Mouse IgG1 κ
Anti-CD25-PE	BD Bioscience	Clone M-A251, Mouse IgG1 κ
Anti-CD45-AF700	BD Bioscience	Clone HI30, Mouse IgG2b κ
Anti-CD45-BV510	BD Bioscience	Clone HI30, Mouse IgG2b κ
Anti-CD56-PEVio770	Miltenyi	Clone AF12-7H3, Mouse IgG1 κ
Anti-CD56-VioBright-FITC	Miltenyi	Clone AF12-7H3, Mouse IgG1 κ
Anti-CD57-APC	BD Bioscience	Clone HNK-1, Mouse IgM κ
Anti-CD69-APC	BD	Clone FN50, Mouse IgG1 κ
Anti-CD127-APC	eBioscience	Clone eBioRDR5, Mouse IgG1 κ
Anti-CD158(KIR2DL1/S1/S3/S5)-PE-Cy7	Biolegend	CloneHP-A4, Mouse IgG2b κ
Anti-CD158e1(KIR3DL1)-PE-Cy7	Biolegend	Clone DX9, Mouse IgG1 κ
Anti-IFNγ-BV421	Biolegend	Clone 4SB3, Mouse IgG1 κ
Anti-IL-1R1-BV421	BD Bioscience	Clone 89412, Mouse IgG1 κ
Anti-IL-18Ra-PE	BD Bioscience	Clone H44, Mouse IgG1 κ
Anti-p-p38-PE	BD Bioscience	Clone 36/p38, Mouse IgG1 κ
Anti-p-p65-PE	BD Bioscience	Clone K10-895.12.50, Mouse IgG2b κ
Anti-p-S6	Cell Signaling Technology	Clone D57.2.2E, Rabbit IgG
Anti-p-STAT-4-PE	BD Bioscience	Clone 38/p-Stat4, Mouse IgG2b κ
Anti-ST2-PE	R&D	Polyclonal goat
Flow cytometry antibodies (Mouse)		
anti-CD11b-APCeFluor 780	eBioscience	Clone M1/70, Rat IgG2b κ
anti-CD27-PerCPeFluor 710	eBioscience	Clone LG.7F9, Haster IgG
anti-IFN-γ-PE	Biolegend	Clone XMG1.2, Rat IgG1 κ
anti-IL-1R-BV421	BD Bioscience	Clone 4E2, Rat IgG2a κ
anti-IL-18Rα-PE	eBioscience	Clone P3TUNYA, Rat IgG2a κ
Anti-NK1.1-APC	BD Bioscience	Clone PK136, Mouse IgG2a κ
anti ST2-PE	BD Bioscience	Clone U29-93, Rat IgG2a κ
Other antibodies		
Anti-goat	Agilent	E0466
Anti-IL-18	MBL	Clone 125-2H, Mouse IgG1 κ
Anti-IL-33	R&D	Clone AF3625, Goat
Anti-NK1.1	BioXCell	Clone PK136
Anti-NKp30	R&D	Clone 210845 Mouse IgG2a κ
Anti-NKp46	R&D	Clone 195314, Mouse IgG2b κ
Anti-PanCK	Agilent	clone AE1-AE3,
Anti-p-STAT-4	Cell Signaling Technology	Y693, Rabbit IgG
Anti-ST2	R&D	Clone 97203, Mouse IgG1 κ
Reagents		

Calcein	Invitrogen	C1430
CTV	Invitrogen	C34557
DAPI	Invitrogen	D1306
DNase I	Sigma-Aldrich	D4263
GolgiPlug	BD bioscience	555029
Lisofylline	Cayman chemicals	10010785
Lymphocyte Separation Medium	Eurobio	CMSMSL0101
Lyse/fix Buffer Phosflow	BD Biosciences	558049
Perm Buffer III Phosflow	BD Biosciences	558050
RPMI 1640 Medium, GlutaMAX	Gibco	61870036
Sulfinpyrazone	Sigma-Aldrich	S9509
Type IV collagenase	Sigma-Aldrich	C5138
Zombie Dye Aqua	Biolegend	423101
Cytokines		
Recombinant Human IFN- α 2b	Schering-Plough	
Recombinant Human IL-1 α	Peprtech	200-01A
Recombinant Human IL-1 β	Peprtech	200-01B
Recombinant Human IL-1RA	Peprtech	200-01RA
Recombinant Human IL-2	Chiron	
Recombinant Human IL-12	Miltenyi	130-096-704
Recombinant Human IL-15	Peprtech	200-15
Recombinant Human IL-18	MBL	B003-5
Recombinant Human IL-33	Miltenyi	130-109-378
Recombinant Mouse IL-1 α	Miltenyi	130-094-050
Recombinant Mouse IL-1 β	Miltenyi	130-094-053
Recombinant Mouse IL-12	Miltenyi	130-096-707
Recombinant Mouse IL-12 (<i>in vivo</i>)	R&D	419-ML
Recombinant Mouse IL-18	MBL	B002-5
Recombinant Mouse IL-33	Miltenyi	130-112-958
Recombinant Mouse IL-33 (<i>in vivo</i>)	Biolegend	580502
Kits		
Bio-Plex Pro™ Human Cytokine 17-plex	BioRad	M5000031YV
CHIP-IT High Sensitivity	Active Motif	53040
Extra Sensitive IFN gamma Mouse ELISA Kit	ThermoFischer	BMS609
FoxP3/Transcription Factor Staining Set	eBioscience	00-5523-00
Human IFN- γ DuoSet ELISA kit	R&D	DY285B
iScript Reverse Transcription kit	BioRad	1708840
MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit	Lonza	LT07-118
NK Cell Isolation Kit, human	Miltenyi	130-092-657
NucleoSpin RNA Kit	Macherey-Nagel	740955
Primers		
GADD45a TaqMan	ThermoFischer	Hs00169255_m1
Negative Primer Set 1 and 2	Active Motif	71001 and 71002
IL1Rap TaqMan	ThermoFischer	Hs00895050_m1
IL1RL1 TaqMan	ThermoFischer	Hs00249384_m1
IL1RL1 (promoter) Forward	Agilent	5'-GTGATCATCGGGTTCAGCTTATC-3'
IL1RL1 (promoter) Reverse	Agilent	5'-GCTTTACTAAATACAACAGCCAGCCT-3'
SimpleChIP Human PRF1 Primers	Cell Signaling Technology	9014S

Baba, Y., Maeda, K., Yashiro, T., Inage, E., Kasakura, K., Suzuki, R., Niyonsaba, F., Hara, M., Tanabe, A., Ogawa, H., et al. (2012). GATA2 is a critical transactivator for the human IL1RL1/ST2 promoter in mast cells/basophils: opposing roles for GATA2 and GATA1 in human IL1RL1/ST2 gene expression. *J. Biol. Chem.* *287*, 32689–32696.

Barry, K.C., Hsu, J., Broz, M.L., Cueto, F.J., Binnewies, M., Combes, A.J., Nelson, A.E., Loo, K., Kumar, R., Rosenblum, M.D., et al. (2018). A natural killer-dendritic cell axis defines checkpoint therapy-responsive tumor microenvironments. *Nat. Med.* *24*, 1178–1191.

Baumann, C., Bonilla, W.V., Fröhlich, A., Helmstetter, C., Peine, M., Hegazy, A.N., Pinschewer, D.D., and Löhning, M. (2015). T-bet- and STAT4-dependent IL-33 receptor expression directly promotes antiviral Th1 cell responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *112*, 4056–4061.

Berrien-Elliott, M.M., Wagner, J.A., and Fehniger, T.A. (2015). Human Cytokine-Induced Memory-Like Natural Killer Cells. *J. Innate Immun* *7*, 563–571.

Bezman, N.A., Kim, C.C., Sun, J.C., Min-Oo, G., Hendricks, D.W., Kamimura, Y., Best, J.A., Goldrath, A.W., Lanier, L.L., and Immunological Genome Project Consortium (2012). Molecular definition of the identity and activation of natural killer cells. *Nat. Immunol.* *13*, 1000–1009.

Björkström, N.K., Riese, P., Heuts, F., Andersson, S., Fauriat, C., Ivarsson, M.A., Björklund, A.T., Flodström-Tullberg, M., Michaëlsson, J., Rottenberg, M.E., et al. (2010). Expression patterns of NKG2A, KIR, and CD57 define a process of CD56dim NK-cell differentiation uncoupled from NK-cell education. *Blood* *116*, 3853–3864.

Bonilla, W.V., Fröhlich, A., Senn, K., Kallert, S., Fernandez, M., Johnson, S., Kreutzfeldt, M., Hegazy, A.N., Schrick, C., Fallon, P.G., et al. (2012). The Alarmin Interleukin-33 Drives Protective Antiviral CD8+ T Cell Responses. *Science* *335*, 984–989.

Böttcher, J.P., Bonavita, E., Chakravarty, P., Blees, H., Cabeza-Cabrerizo, M., Sammicheli, 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.

Broz, M.L., Binnewies, M., Boldajipour, B., Nelson, A.E., Pollack, J.L., Erle, D.J., Barczak, A., Rosenblum, M.D., Daud, A., Barber, D.L., et al. (2014). Dissecting the tumor myeloid compartment reveals rare activating antigen-presenting cells critical for T cell immunity. *Cancer Cell* *26*, 638–652.

Brunner, S.M., Rubner, C., Kesselring, R., Martin, M., Griesshammer, E., Ruemmele, P., Stempf, T., Teufel, A., Schlitt, H.J., and Fichtner-Feigl, S. (2015). Tumor-infiltrating, interleukin-33-producing effector-memory CD8(+) T cells in resected hepatocellular carcinoma prolong patient survival. *Hepatology* *61*, 1957–1967.

Caligiuri, M.A., Zmuidzinas, A., Manley, T.J., Levine, H., Smith, K.A., and Ritz, J. (1990). Functional consequences of interleukin 2 receptor expression on resting human lymphocytes. Identification of a novel natural killer cell subset with high affinity receptors. *J. Exp. Med.* *171*, 1509–1526.

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

- Carson, W.E., Giri, J.G., Lindemann, M.J., Linett, M.L., Ahdieh, M., Paxton, R., Anderson, D., Eisenmann, J., Grabstein, K., and Caligiuri, M.A. (1994). Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor. *J. Exp. Med.* *180*, 1395–1403.
- Cayrol, C., and Girard, J.-P. (2018). Interleukin-33 (IL-33): A nuclear cytokine from the IL-1 family. *Immunological Reviews* *281*, 154–168.
- Cerwenka, A., and Lanier, L.L. (2001). Natural killer cells, viruses and cancer. *Nature Reviews Immunology* *1*, 41–49.
- Chaix, J., Tessmer, M.S., Hoebe, K., Fuséri, N., Ryffel, B., Dalod, M., Alexopoulou, L., Beutler, B., Brossay, L., Vivier, E., et al. (2008). Cutting Edge: Priming of NK Cells by IL-18. *The Journal of Immunology* *181*, 1627–1631.
- Chen, S.-F., Nieh, S., Jao, S.-W., Wu, M.-Z., Liu, C.-L., Chang, Y.-C., and Lin, Y.-S. (2013). The paracrine effect of cancer-associated fibroblast-induced interleukin-33 regulates the invasiveness of head and neck squamous cell carcinoma. *J. Pathol.* *231*, 180–189.
- Chiossone, L., Dumas, P.-Y., Vienne, M., and Vivier, E. (2018). Natural killer cells and other innate lymphoid cells in cancer. *Nature Reviews Immunology* *18*, 671–688.
- Collins, P.L., Cella, M., Porter, S.I., Li, S., Gurewitz, G.L., Hong, H.S., Johnson, R.P., Oltz, E.M., and Colonna, M. (2019). Gene Regulatory Programs Conferring Phenotypic Identities to Human NK Cells. *Cell* *176*, 348–360.e12.
- Cooper, M.A., Fehniger, T.A., and Caligiuri, M.A. (2001a). The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends in Immunology* *22*, 633–640.
- 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 CD56bright subset. *Blood* *97*, 3146–3151.
- 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.
- Cui, G., Qi, H., Gundersen, M.D., Yang, H., Christiansen, I., Sørbye, S.W., Goll, R., and Florholmen, J. (2015). Dynamics of the IL-33/ST2 network in the progression of human colorectal adenoma to sporadic colorectal cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* *64*, 181–190.
- Cursons, J., Souza-Fonseca-Guimaraes, 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* *7*, 1162–1174.
- Dahlberg, C.I.M., Sarhan, D., Chrobok, M., Duru, A.D., and Alici, E. (2015). Natural Killer Cell-Based Therapies Targeting Cancer: Possible Strategies to Gain and Sustain Anti-Tumor Activity. *Front Immunol* *6*, 605.
- Denkert, C., Minckwitz, G. von, Darb-Esfahani, S., Lederer, B., Heppner, B.I., Weber, K.E., Budczies, J., Huober, J., Klauschen, F., Furlanetto, J., et al. (2018). Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. *The Lancet Oncology* *19*, 40–50.

- Dreos, R., Ambrosini, G., Périer, R.C., and Bucher, P. (2015). The Eukaryotic Promoter Database: expansion of EPDnew and new promoter analysis tools. *Nucleic Acids Res.* *43*, D92–96.
- Eissmann, M.F., Dijkstra, C., Wouters, M.A., Baloyan, D., Mouradov, D., Nguyen, P.M., Davalos-Salas, M., Putoczki, T.L., Sieber, O.M., Mariadason, J.M., et al. (2018). Interleukin 33 Signaling Restrains Sporadic Colon Cancer in an Interferon- γ -Dependent Manner. *Cancer Immunol Res* *6*, 409–421.
- Fang, M., Li, Y., Huang, K., Qi, S., Zhang, J., Zgodzinski, W., Majewski, M., Wallner, G., Gozdz, S., Macek, P., et al. (2017). IL33 Promotes Colon Cancer Cell Stemness via JNK Activation and Macrophage Recruitment. *Cancer Res.* *77*, 2735–2745.
- Fauriat, C., Long, E.O., Ljunggren, H.-G., and Bryceson, Y.T. (2010). Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood* *115*, 2167–2176.
- Fehniger, T.A., and Cooper, M.A. (2016). Harnessing NK Cell Memory for Cancer Immunotherapy. *Trends Immunol.* *37*, 877–888.
- Fehniger, T.A., Cooper, M.A., Nuovo, G.J., Cella, M., Facchetti, F., Colonna, M., and Caligiuri, M.A. (2003). CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood* *101*, 3052–3057.
- Fournié, J.-J., and Poupot, M. (2018). The Pro-tumorigenic IL-33 Involved in Antitumor Immunity: A Yin and Yang Cytokine. *Front Immunol* *9*, 2506.
- Freud, A.G., Mundy-Bosse, B.L., Yu, J., and Caligiuri, M.A. (2017). The Broad Spectrum of Human Natural Killer Cell Diversity. *Immunity* *47*, 820–833.
- Gao, K., Li, X., Zhang, L., Bai, L., Dong, W., Gao, K., Shi, G., Xia, X., Wu, L., and Zhang, L. (2013). Transgenic expression of IL-33 activates CD8(+) T cells and NK cells and inhibits tumor growth and metastasis in mice. *Cancer Lett.* *335*, 463–471.
- Gao, X., Wang, X., Yang, Q., Zhao, X., Wen, W., Li, G., Lu, J., Qin, W., Qi, Y., Xie, F., et al. (2015). Tumoral expression of IL-33 inhibits tumor growth and modifies the tumor microenvironment through CD8+ T and NK cells. *J. Immunol.* *194*, 438–445.
- Garlanda, C., Dinarello, C.A., and Mantovani, A. (2013). The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity* *39*, 1003–1018.
- Hamann, I., Unterwalder, N., Cardona, A.E., Meisel, C., Zipp, F., Ransohoff, R.M., and Infante-Duarte, C. (2011). Analyses of phenotypic and functional characteristics of CX3CR1-expressing natural killer cells. *Immunology* *133*, 62–73.
- Hammer, Q., and Romagnani, C. (2017). About Training and Memory: NK-Cell Adaptation to Viral Infections. *Adv. Immunol.* *133*, 171–207.
- Hanna, J., Bechtel, P., Zhai, Y., Youssef, F., McLachlan, K., and Mandelboim, O. (2004). Novel insights on human NK cells' immunological modalities revealed by gene expression profiling. *J. Immunol.* *173*, 6547–6563.
- Hardman, C., and Ogg, G. (2016). Interleukin-33, friend and foe in type-2 immune responses. *Curr. Opin. Immunol.* *42*, 16–24.

- Hubert, M., Gobbin, E., Couillault, C., Manh, T.-P.V., Doffin, A.-C., Berthet, J., Rodriguez, C., Ollion, V., Kielbassa, J., Sajous, C., et al. (2020). IFN-III is selectively produced by cDC1 and predicts good clinical outcome in breast cancer. *Sci Immunol* 5.
- Huntington, N.D., Legrand, N., Alves, N.L., Jaron, B., Weijer, K., Plet, A., Corcuff, E., Mortier, E., Jacques, Y., Spits, H., et al. (2009). IL-15 trans-presentation promotes human NK cell development and differentiation in vivo. *J. Exp. Med.* 206, 25–34.
- Jafarzadeh, A., Minaee, K., Farsinejad, A.-R., Nemati, M., Khosravimashizi, A., Daneshvar, H., Mohammadi, M.M., Sheikhi, A., and Ghaderi, A. (2015). Evaluation of the circulating levels of IL-12 and IL-33 in patients with breast cancer: influences of the tumor stages and cytokine gene polymorphisms. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 18, 1189–1198.
- Jin, Z., Lei, L., Lin, D., Liu, Y., Song, Y., Gong, H., Zhu, Y., Mei, Y., Hu, B., Wu, Y., et al. (2018). IL-33 Released in the Liver Inhibits Tumor Growth via Promotion of CD4⁺ and CD8⁺ T Cell Responses in Hepatocellular Carcinoma. *J.I.* 201, 3770–3779.
- Judge, S.J., Murphy, W.J., and Canter, R.J. (2020). Characterizing the Dysfunctional NK Cell: Assessing the Clinical Relevance of Exhaustion, Anergy, and Senescence. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10.
- Kobayashi, M., Fitz, L., Ryan, M., Hewick, R.M., Clark, S.C., Chan, S., Loudon, R., Sherman, F., Perussia, B., and Trinchieri, G. (1989). Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J. Exp. Med.* 170, 827–845.
- Kohrt, H.E., Houot, R., Marabelle, A., Cho, H.J., Osman, K., Goldstein, M., Levy, R., and Brody, J. (2012). Combination strategies to enhance antitumor ADCC. *Immunotherapy* 4, 511–527.
- Koster, R., Panagiotou, O.A., Wheeler, W.A., Karlins, E., Gastier-Foster, J.M., Caminada de Toledo, S.R., Petrilli, A.S., Flanagan, A.M., Tirabosco, R., Andrulis, I.L., et al. (2018). Genome-wide association study identifies the GLDC/IL33 locus associated with survival of osteosarcoma patients. *Int. J. Cancer* 142, 1594–1601.
- Landskron, G., De la Fuente López, M., Dubois-Camacho, K., Díaz-Jiménez, D., Orellana-Serradell, O., Romero, D., Sepúlveda, S.A., Salazar, C., Parada-Venegas, D., Quera, R., et al. (2019). Interleukin 33/ST2 Axis Components Are Associated to Desmoplasia, a Metastasis-Related Factor in Colorectal Cancer. *Front. Immunol.* 10.
- Lau, C.M., Adams, N.M., Geary, C.D., Weizman, O.-E., Rapp, M., Pritykin, Y., Leslie, C.S., and Sun, J.C. (2018). Epigenetic control of innate and adaptive immune memory. *Nat. Immunol.* 19, 963–972.
- Lauwerys, B.R., Renauld, J.C., and Houssiau, F.A. (1999). Synergistic proliferation and activation of natural killer cells by interleukin 12 and interleukin 18. *Cytokine* 11, 822–830.
- Lee, S., Stewart, S., Nagtegaal, I., Luo, J., Wu, Y., Colditz, G., Medina, D., and Allred, D.C. (2012). Differentially Expressed Genes Regulating the Progression of Ductal Carcinoma In Situ to Invasive Breast Cancer. *Cancer Res* 72, 4574–4586.
- Liao, W., Lin, J.-X., and Leonard, W.J. (2011). IL-2 family cytokines: new insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation. *Current Opinion in Immunology* 23, 598–604.
- Liew, F.Y., Girard, J.-P., and Turnquist, H.R. (2016). Interleukin-33 in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 676–689.
- Liu, S., Dhar, P., and Wu, J.D. (2019). NK Cell Plasticity in Cancer. *J Clin Med* 8.

- Lo Nigro, C., Macagno, M., Sangiolo, D., Bertolaccini, L., Aglietta, M., and Merlano, M.C. (2019). NK-mediated antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in solid tumors: biological evidence and clinical perspectives. *Ann Transl Med* 7.
- Long, A., Dominguez, D., Qin, L., Chen, S., Fan, J., Zhang, M., Fang, D., Zhang, Y., Kuzel, T.M., and Zhang, B. (2018). Type 2 Innate Lymphoid Cells Impede IL-33–Mediated Tumor Suppression. *The Journal of Immunology*.
- Lopez-Vergès, S., Milush, J.M., Pandey, S., York, V.A., Arakawa-Hoyt, J., Pircher, H., Norris, P.J., Nixon, D.F., and Lanier, L.L. (2010). CD57 defines a functionally distinct population of mature NK cells in the human CD56dimCD16+ NK-cell subset. *Blood* 116, 3865–3874.
- Lopez-Vergès, S., Milush, J.M., Schwartz, B.S., Pando, M.J., Jarjoura, J., York, V.A., Houchins, J.P., Miller, S., Kang, S.-M., Norris, P.J., et al. (2011). Expansion of a unique CD57+*NKG2C* natural killer cell subset during acute human cytomegalovirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 14725–14732.
- Lutz, C.T., Karapetyan, A., Al-Attar, A., Shelton, B.J., Holt, K.J., Tucker, J.H., and Presnell, S.R. (2011). Human natural killer cells proliferate and die in vivo more rapidly than T cells in healthy young and elderly adults. *J Immunol* 186, 4590–4598.
- Matta, B.M., Lott, J.M., Mathews, L.R., Liu, Q., Rosborough, B.R., Blazar, B.R., and Turnquist, H.R. (2014). IL-33 Is an Unconventional Alarmin That Stimulates IL-2 Secretion by Dendritic Cells To Selectively Expand IL-33R/ST2+ Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology* 193, 4010–4020.
- Maywald, R.L., Doerner, S.K., Pastorelli, L., De Salvo, C., Benton, S.M., Dawson, E.P., Lanza, D.G., Berger, N.A., Markowitz, S.D., Lenz, H.-J., et al. (2015). IL-33 activates tumor stroma to promote intestinal polyposis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, E2487-2496.
- Mertz, K.D., Mager, L.F., Wasmer, M.-H., Thiesler, T., Koelzer, V.H., Ruzzante, G., Joller, S., Murdoch, J.R., Brümendorf, T., Genitsch, V., et al. (2016). The IL-33/ST2 pathway contributes to intestinal tumorigenesis in humans and mice. *Oncoimmunology* 5, e1062966.
- Michel, T., Poli, A., Cuapio, A., Briquemont, B., Iserentant, G., Ollert, M., and Zimmer, J. (2016). Human CD56bright NK Cells: An Update. *J. Immunol.* 196, 2923–2931.
- Min-Oo, G., Kamimura, Y., Hendricks, D.W., Nabekura, T., and Lanier, L.L. (2013). Natural killer cells: walking three paths down memory lane. *Trends Immunol.* 34, 251–258.
- Mittal, D., Vijayan, D., Putz, E.M., Aguilera, A.R., Markey, K.A., Straube, J., Kazakoff, S., Nutt, S.L., Takeda, K., Hill, G.R., et al. (2017). Interleukin-12 from CD103+ *Batf3*-Dependent Dendritic Cells Required for NK-Cell Suppression of Metastasis. *Cancer Immunol Res* 5, 1098–1108.
- Molofsky, A.B., Van Gool, F., Liang, H.-E., Van Dyken, S.J., Nussbaum, J.C., Lee, J., Bluestone, J.A., and Locksley, R.M. (2015). Interleukin-33 and Interferon- γ Counter-Regulate Group 2 Innate Lymphoid Cell Activation during Immune Perturbation. *Immunity* 43, 161–174.
- Moussion, C., Ortega, N., and Girard, J.-P. (2008). The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel “alarmin”? *PLoS ONE* 3, e3331.
- Nabekura, T., Girard, J.-P., and Lanier, L.L. (2015). IL-33 receptor ST2 amplifies the expansion of NK cells and enhances host defense during mouse cytomegalovirus infection. *J. Immunol.* 194, 5948–5952.
- Nakahira, M., Ahn, H.-J., Park, W.-R., Gao, P., Tomura, M., Park, C.-S., Hamaoka, T., Ohta, T., Kurimoto, M., and Fujiwara, H. (2002). Synergy of IL-12 and IL-18 for IFN- γ gene expression: IL-12-induced

- STAT4 contributes to IFN-gamma promoter activation by up-regulating the binding activity of IL-18-induced activator protein 1. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md. : 1950) *168*, 1146–1153.
- Ochayon, D.E., Ali, A., Alarcon, P.C., Krishnamurthy, D., Kottyan, L.C., Borchers, M.T., and Waggoner, S.N. (2020). IL-33 promotes type 1 cytokine expression via p38 MAPK in human NK cells. *J. Leukoc. Biol.*
- Pastille, E., Wasmer, M.-H., Adamczyk, A., Vu, V.P., Mager, L.F., Phuong, N.N.T., Palmieri, V., Simillion, C., Hansen, W., Kasper, S., et al. (2019). The IL-33/ST2 pathway shapes the regulatory T cell phenotype to promote intestinal cancer. *Mucosal Immunology* *12*, 990–1003.
- Platanias, L.C. (2005). Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nature Reviews. Immunology* *5*, 375–386.
- Qi, L., Zhang, Q., Miao, Y., Kang, W., Tian, Z., Xu, D., Xiao, W., and Fang, F. (2020). Interleukin-33 activates and recruits natural killer cells to inhibit pulmonary metastatic cancer development. *Int. J. Cancer* *146*, 1421–1434.
- Ramos, R.N., Rodriguez, C., Hubert, M., Ardin, M., Treilleux, I., Ries, C.H., Lavergne, E., Chabaud, S., Colombe, A., Trédan, O., et al. (2020). CD163+ tumor-associated macrophage accumulation in breast cancer patients reflects both local differentiation signals and systemic skewing of monocytes. *Clin Transl Immunology* *9*, e1108.
- Robertson, M.J. (2002). Role of chemokines in the biology of natural killer cells. *Journal of Leukocyte Biology* *71*, 173–183.
- Romagnani, C., Juelke, K., Falco, M., Morandi, B., D’Agostino, A., Costa, R., Ratto, G., Forte, G., Carrega, P., Lui, G., et al. (2007). CD56brightCD16- killer Ig-like receptor- NK cells display longer telomeres and acquire features of CD56dim NK cells upon activation. *J. Immunol.* *178*, 4947–4955.
- Rössle, M., Cathomas, G., Bonapace, L., Sachs, M., Dehler, S., Storz, M., Huber, G., Moch, H., Junt, T., and Mertz, K.D. (2016). Interleukin-33 Expression Indicates a Favorable Prognosis in Malignant Salivary Gland Tumors. *Int. J. Surg. Pathol.* *24*, 394–400.
- Rusakiewicz, S., Semeraro, M., Sarabi, M., Desbois, M., Locher, C., Mendez, R., Vimond, N., Concha, A., Garrido, F., Isambert, N., et al. (2013). Immune infiltrates are prognostic factors in localized gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res.* *73*, 3499–3510.
- Saranchova, I., Han, J., Huang, H., Fenninger, F., Choi, K.B., Munro, L., Pfeifer, C., Welch, I., Wyatt, A.W., Fazli, L., et al. (2016). Discovery of a Metastatic Immune Escape Mechanism Initiated by the Loss of Expression of the Tumour Biomarker Interleukin-33. *Sci Rep* *6*, 30555.
- Schiering, C., Krausgruber, T., Chomka, A., Fröhlich, A., Adelman, K., Wohlfert, E.A., Pott, J., Griseri, T., Bollrath, J., Hegazy, A.N., et al. (2014). The alarmin IL-33 promotes regulatory T-cell function in the intestine. *Nature* *513*, 564–568.
- 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.
- Schmitz, J., Owyang, A., Oldham, E., Song, Y., Murphy, E., McClanahan, T.K., Zurawski, G., Moshrefi, M., Qin, J., Li, X., et al. (2005). IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity* *23*, 479–490.
- Shimasaki, N., Jain, A., and Campana, D. (2020). NK cells for cancer immunotherapy. *Nat Rev Drug Discov.*

- Smithgall, M.D., Comeau, M.R., Park Yoon, B.-R., Kaufman, D., Armitage, R., and Smith, D.E. (2008). IL-33 amplifies both Th1- and Th2-type responses through its activity on human basophils, allergen-reactive Th2 cells, iNKT and NK Cells. *Int Immunol* *20*, 1019–1030.
- Su, L., Zhou, Q., Wang, C., Wu, X., Wang, X., Li, J., Zhu, Z., and Liu, B. (2015). Abstract 5069: IL-33 secreted by cancer-associated fibroblasts mediates epithelial-stromal interactions and promotes gastric cancer invasion via ERK signaling pathway. *Cancer Res* *75*, 5069–5069.
- Sun, J.C., Beilke, J.N., and Lanier, L.L. (2009). Adaptive Immune Features of Natural Killer Cells. *Nature* *457*, 557–561.
- Thierfelder, W.E., van Deursen, J.M., Yamamoto, K., Tripp, R.A., Sarawar, S.R., Carson, R.T., Sangster, M.Y., Vignali, D.A.A., Doherty, P.C., Grosveld, G.C., et al. (1996). Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells. *Nature* *382*, 171–174.
- Tong, X., Barbour, M., Hou, K., Gao, C., Cao, S., Zheng, J., Zhao, Y., Mu, R., and Jiang, H.-R. (2016). Interleukin-33 predicts poor prognosis and promotes ovarian cancer cell growth and metastasis through regulating ERK and JNK signaling pathways. *Mol Oncol* *10*, 113–125.
- Trinchieri, G. (2003). Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology* *3*, 133–146.
- Tu, M.M., Rahim, M.M.A., Sayed, C., Mahmoud, A.B., and Makrigiannis, A.P. (2017). Immunosurveillance and Immunoediting of Breast Cancer via Class I MHC Receptors. *Cancer Immunol Res* *5*, 1016–1028.
- Verronèse, E., Delgado, A., Valladeau-Guilemond, J., Garin, G., Guillemaut, S., Tredan, O., Ray-Coquard, I., Bachelot, T., N’Kodia, A., Bardin-Dit-Courageot, C., et al. (2016). Immune cell dysfunctions in breast cancer patients detected through whole blood multi-parametric flow cytometry assay. *Oncolimmunology* *5*, e1100791.
- Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., and Ugolini, S. (2008). Functions of natural killer cells. *Nat. Immunol.* *9*, 503–510.
- Wang, W., Erbe, A.K., Hank, J.A., Morris, Z.S., and Sondel, P.M. (2015). NK Cell-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity in Cancer Immunotherapy. *Front Immunol* *6*.
- Yang, M., Feng, Y., Yue, C., Xu, B., Chen, L., Jiang, J., Lu, B., and Zhu, Y. (2018). Lower expression level of IL-33 is associated with poor prognosis of pulmonary adenocarcinoma. *PLOS ONE* *13*, e0193428.
- Yang, Q., Li, G., Zhu, Y., Liu, L., Chen, E., Turnquist, H., Zhang, X., Finn, O.J., Chen, X., and Lu, B. (2011). IL-33 synergizes with TCR and IL-12 signaling to promote the effector function of CD8+ T cells. *European Journal of Immunology* *41*, 3351–3360.
- Yang, Y., Wang, J.-B., Li, Y.-M., Zhao, Y.U., Wang, R., Wu, Q., Zheng, R.-S., and Ou, Y.-R. (2016). Role of IL-33 expression in oncogenesis and development of human hepatocellular carcinoma. *Oncol Lett* *12*, 429–436.
- Yu, J., Mao, H.C., Wei, M., Hughes, T., Zhang, J., Park, I., Liu, S., McClory, S., Marcucci, G., Trotta, R., et al. (2010). CD94 surface density identifies a functional intermediary between the CD56bright and CD56dim human NK-cell subsets. *Blood* *115*, 274–281.
- Zhang, P., Liu, X.-K., Chu, Z., Ye, J.C., Li, K.-L., Zhuang, W.-L., Yang, D.-J., and Jiang, Y.-F. (2012). Detection of interleukin-33 in serum and carcinoma tissue from patients with hepatocellular carcinoma and its clinical implications. *J. Int. Med. Res.* *40*, 1654–1661.

Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2014). CD103+ dendritic cells producing interleukin-12 in anticancer immunosurveillance. *Cancer Cell* 26, 591–593.

*Discussion
et perspectives*

Les résultats obtenus au cours de ma thèse nous ont permis de démontrer que l'IL-33, lorsqu'elle est combinée avec l'IL-12, est un activateur puissant des fonctions sécrétrices et cytotoxiques des cellules NK chez l'homme et la souris, en contexte physiologique et tumoral. Dans cette synergie, l'IL-12 est nécessaire pour activer la voie STAT-4 qui régule directement l'expression du récepteur ST2 à la surface d'une sous-population de cellules NK. La caractérisation phénotypique, fonctionnelle et transcriptionnelle des cellules NK ST2⁺ les identifie comme une sous-population appartenant aux cellules NK CD56^{dim} mais caractérisées par un programme transcriptionnel unique et un potentiel hautement polyfonctionnel (production de cytokines, cytotoxicité et prolifération). En effet, ces cellules expriment des gènes associés à des marqueurs et des fonctions propres aux cellules NK CD56^{bright} sécrétrices ou aux cellules NK CD56^{dim} cytotoxiques respectivement. Dans un modèle murin de cancer mammaire, nous avons observé que l'administration combinée d'IL-33 et d'IL-12 induit une diminution de la croissance tumorale et l'augmentation de la survie, via un mécanisme dépendant des cellules NK et associé à la production d'IFN- γ . Chez l'homme, à partir de prélèvements de sang et de tumeurs issus de patientes atteintes de cancer du sein, nous avons observé que la combinaison de l'IL-33 et de l'IL-12 induit l'activation de la voie NFkB et la production d'IFN- γ dans une partie des cellules NK circulantes et intratumorales *ex vivo*. Dans l'ensemble, ces résultats identifient l'IL-33 comme un activateur puissant d'une sous-population distincte de cellules NK polyfonctionnelles à fort potentiel thérapeutique dans le cancer. Enfin, l'étude des données cliniques et transcriptomiques de la base de données publiques The Cancer Genome Atlas associe l'expression de l'IL-33 avec une augmentation de la survie des patientes dans plusieurs cancers dont le cancer du sein, en accord avec un rôle anti-tumoral de l'IL-33 endogène.

Dans cette partie, nous discuterons des résultats obtenus, de leur portée et des perspectives qu'ils offrent. Nous évoquerons dans un premier temps les caractéristiques de l'activation des cellules NK par l'IL-33 en contexte physiologique. Dans une deuxième partie, nous aborderons le rôle de l'IL-33 en contexte tumoral. Enfin, nous discuterons de l'intérêt thérapeutique de l'activation des cellules NK par l'IL-33 en contexte tumoral.

Partie 1 : L'IL-33, puissante activatrice d'une sous-population de cellules NK polyfonctionnelles

Nos résultats confirment que l'IL-33 est un puissant activateur des cellules NK soulignant ainsi son rôle initialement sous-estimé dans la régulation des réponses immunitaires de type-1. Les caractéristiques de cette activation seront discutées dans cette partie.

I. Spécificités de l'activation des cellules NK par l'IL-33

1. La synergie avec l'IL-12

1.1. Mise en évidence de la protéine ST2 sur les cellules NK humaines

Une de nos observations majeures est la dépendance vis-à-vis de l'IL-12 pour induire l'expression de ST2 sur les cellules NK et permettre l'activation de leurs fonctions effectrices anti-tumorales en réponse à l'IL-33. Cette dépendance à l'IL-12 avait déjà été observée *in vitro* par

plusieurs groupes, bien que les mécanismes sous-jacents demeuraient partiellement identifiés (Smithgall et al., 2008; Bourgeois et al., 2009; Ochayon et al., 2020). En effet, ces études se sont heurtées à l'incapacité de mettre en évidence l'expression de la protéine ST2 à la surface des cellules NK humaines, malgré une augmentation de l'ARNm codant ST2 et la mise en évidence d'une réponse fonctionnelle de ces dernières en présence d'IL-33. En accord avec ces observations, seul un anticorps parmi ceux disponibles sur le marché à ce jour nous a permis de visualiser par cytométrie en flux, l'expression de ST2 à la surface des cellules NK humaines (en présence d'IL-12), bien que faible par rapport à l'expression observée sur des basophiles (non activés) (**Figure complémentaire 1**). A ce titre, notre étude correspond à la première mise en évidence de l'expression du récepteur ST2 à la surface des cellules NK humaines. Toutefois, certaines de nos expériences ont révélé un nombre plus élevé de cellules NK qui répondent à l'IL-33 en produisant de l'IFN- γ par rapport au nombre de cellules NK qui expriment ST2. Ces observations suggèrent que la détection de la protéine ST2 dans nos conditions expérimentales n'est toujours pas optimale et la proportion de cellules NK ST2⁺ est probablement sous-estimée. De manière plus anecdotique, nous avons observé que l'expression de la chaîne accessoire IL-1RAcP sur les cellules NK n'est pas régulée en réponse à l'IL-12. Ces résultats diffèrent de l'observation réalisée en contexte viral chez la souris montrant que l'expression d'IL-1RAcP est induite de manière similaire avec celle de ST2 (Kearley et al., 2015). Ceci peut s'expliquer par des différences de régulation de l'expression de la chaîne accessoire entre les deux espèces ou selon le contexte biologique.

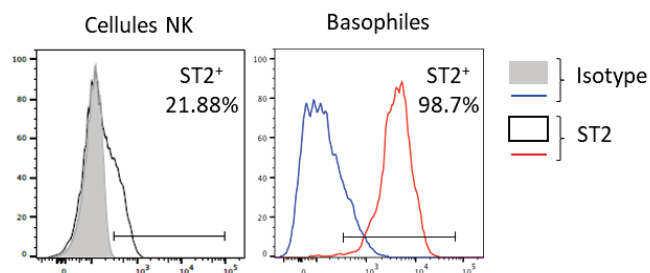


Figure complémentaire 1. L'expression de ST2 sur les cellules NK est détectable mais plus faible que sur les basophiles chez l'homme

Analyse de l'expression de ST2 par cytométrie en flux sur les cellules NK activées avec de l'IL-12 pendant 24hrs et sur les basophiles humains cultivés dans du milieu pendant 24hrs, après isolement de sang périphérique. Pour les cellules NK, l'histogramme rempli en gris correspond à l'isotype contrôle et l'histogramme noir à l'anticorps anti-ST2. Pour les basophiles, l'histogramme bleu correspond à l'isotype contrôle et l'histogramme rouge à l'anticorps anti-ST2.

De manière intéressante, nous avons observé que la production d'IFN- γ par les cellules NK en réponse à l'IL-33 est progressivement perdue dans les heures suivant le retrait de l'IL-12 *in vitro* (**Figure complémentaire 2**), montrant ainsi la nécessité permanente de l'IL-12 pour maintenir la réponse des cellules NK à l'IL-33. En effet, après une pré-activation en IL-12 de 6hrs ou 24hrs, les taux d'IFN- γ produits en réponse à une stimulation secondaire par l'IL-12 et l'IL-33 sont respectivement 100 et 20 fois supérieurs par rapport à une stimulation secondaire par l'IL-33 seule (**Figure complémentaire 2**). Cette donnée prend toute son importance dans les expériences réalisées à partir de cellules NK isolées de tumeurs de patientes dont nous discuterons dans la dernière partie de ce chapitre.

En conclusion, contrairement aux cellules de l'immunité de type 2 qui expriment fortement ST2 de manière constitutive, nos résultats montrent que l'expression de ST2 est inductible et modérée dans les cellules NK humaines et murines.

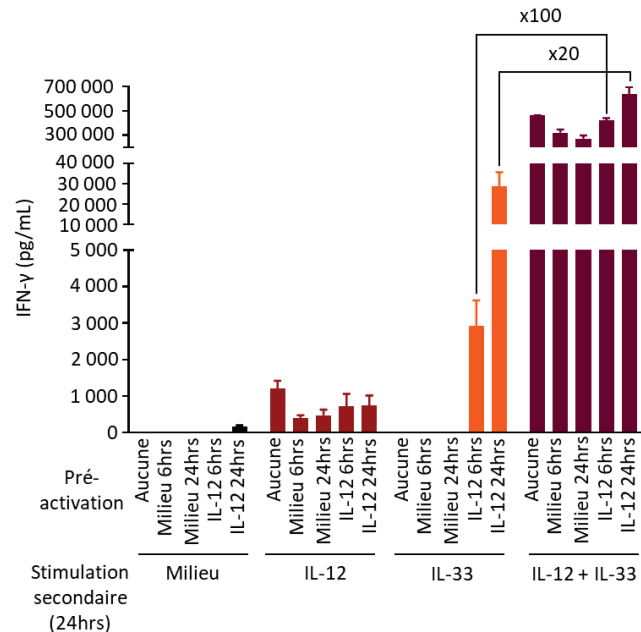


Figure complémentaire 2. La présence d'IL-12 est strictement nécessaire pour maintenir la réponse des cellules NK à l'IL-33

Analyse de la production d'IFN- γ par les cellules NK humaines pré-activées en présence d'IL-12 (10ng/mL) ou de milieu pendant 6hrs ou 24hrs puis re-stimulées pendant 24hrs avec du milieu, de l'IL-12 (10ng/mL) seule, de l'IL-33 seule (10ng/mL) ou la combinaison d'IL-12 et d'IL-33 (10ng/mL chaque cytokine).

1.2. Comparaison avec l'IL-18

La synergie de l'IL-33 avec l'IL-12 rappelle celle observée entre l'IL-12 et l'IL-18, autre cytokine de la famille des IL-1s, où l'activation de STAT-4 par l'IL-12 et de la voie JNK/c-jun (MAPKinases) par l'IL-18 induit la formation d'un complexe STAT-4/c-jun capable de se fixer sur le promoteur du gène *IFNG* pour induire son expression (Chan et al., 1992; Robinson et al., 1997; Lauwerys et al., 1999; Nakahira et al., 2002). Par ailleurs, l'activation de la voie p38 (MAPKinases) par l'IL-18 permet de stabiliser les ARNm *IFNG* nouvellement formés (Mavropoulos et al., 2005). Ainsi, l'IL-33 qui active également les voies des MAPKinases JNK et p38, agit probablement via des mécanismes similaires à l'IL-18 pour coopérer avec l'IL-12. Par exemple, Ochayon *et al* ont récemment montré que l'activation de la voie MAPK p38 en réponse à l'IL-33 dans les cellules NK augmente la stabilité des transcrits de l'IFN- γ , comme décrit par Mavropoulos *et al* pour l'IL-18 (Mavropoulos et al., 2005), et déclenche le clivage du TNF à la surface cellulaire et donc sa sécrétion en induisant l'expression de la métalloprotéinase ADAM17 (Ochayon et al., 2020). A travers nos résultats, l'IL-33 apparaît quasi systématiquement comme le second activateur le plus puissant des cellules NK, après l'IL-18. Ceci peut s'expliquer par une expression constitutive du récepteur à l'IL-18 à la surface de toutes les cellules NK alors que l'expression de ST2 est induite et ce uniquement sur un sous-type de cellules NK. En accord avec cette hypothèse, à partir de 72hrs, temps auquel nous avons observé une expression optimale de ST2, les quantités d'IFN- γ produites en réponse à l'IL-12 combinée à l'IL-33 sont similaires à celles observées en réponse à l'IL-12 combinée à l'IL-18. Par ailleurs, à des concentrations plus faibles (1ng/mL par rapport

à 10ng/mL), l'IL-33 induit une sécrétion plus importante que l'IL-18 lorsque les cytokines sont respectivement combinées à l'IL-12. Ainsi, lorsque l'expression de ST2 est optimale, l'IL-33 est un activateur tout aussi si ce n'est plus puissant que l'IL-18.

Par ailleurs, nous avons identifié un ensemble de spécificités justifiant l'importance de l'activité de l'IL-33 sur les cellules NK par rapport à l'IL-18. Tout d'abord, parmi l'ensemble des combinaisons évaluées, seule la combinaison d'IL-33 et d'IL-12 induit la prolifération des cellules NK CD56^{dim}, qui présentent normalement des capacités prolifératives réduites (Lutz et al., 2011). Chez la souris, en contexte d'infection par le virus MCMV, il a été observé que l'expression de ST2 est nécessaire pour induire la prolifération des cellules NK spécifiquement dirigées contre le virus en réponse à l'IL-33, permettant ainsi le contrôle viral (Nabekura et al., 2015). De plus, la sécrétion de TNF- α , en accord avec Ochayon *et al* (Ochayon et al., 2020), ainsi que des chimiokines CCL3 et CCL4 par les cellules NK en réponse à la combinaison d'IL-33 et d'IL-12 est supérieure à celle induite par la combinaison d'IL-18 avec l'IL-12. Dans la continuité de cette observation, contrairement à l'IL-18 et aux IL-1s, seule l'IL-33 est capable d'induire un sécrétome inflammatoire par une même sous-population de cellules NK (*i. e.* les cellules NK CD56^{dim}) illustré par la production concomitante de plusieurs cytokines (IFN- γ , TNF- α , IL8, IL6) et chimiokines (CCL3, CCL4 et CCL5) pro-inflammatoires. Cette observation suggère un rôle clé des cellules NK ST2⁺ dans le recrutement de cellules immunitaires dans les tissus inflammés. En outre, les cellules NK CD56^{dim} présentent également une cytotoxicité accrue en réponse à l'IL-33 combinée à l'IL-12, soulignant ainsi la polyfonctionnalité de cette sous-population spécifiquement activée par l'IL-33.

De manière intéressante, l'activation préférentielle des fonctions sécrétrices des cellules NK CD56^{dim} par l'IL-33 va à l'encontre de nombreux principes communément admis, selon lesquels les cellules NK CD56^{dim} présentent une expression réduite des récepteurs aux cytokines et répondent plutôt à l'engagement de leurs récepteurs activateurs qu'à la présence de cytokines (Hanna et al., 2004; Fauriat et al., 2010; Schlums et al., 2015); et qu'elles ont une activité plutôt cytotoxique que sécrétrice (Fehniger et al., 1999). Ainsi, en plus d'augmenter leur fonction cytotoxique, l'IL-33 semble conférer des fonctions sécrétrices uniques aux cellules NK CD56^{dim}, qui peuvent jouer un rôle dans le recrutement et l'activation d'une panoplie de populations immunitaires, fonction généralement associée aux cellules NK CD56^{bright} (Cooper et al., 2001; Fehniger et al., 2003; Vitale et al., 2005).

Enfin, nous avons observé une exclusion entre l'expression d'IL-33 et d'IL-18 dans les dilacérats obtenus à partir de tumeurs du sein (**Figure complémentaire 3**), soulignant ainsi que ces deux cytokines sont produites par des cellules différentes et dans des contextes distincts, et régulent donc l'activité des cellules immunitaires de manière non redondante. Ainsi, la caractérisation extensive des cellules NK par analyse de leur profil transcriptomique par RNA-seq en réponse à une activation par la combinaison d'IL-33 avec l'IL-12 par rapport à la combinaison d'IL-18 avec l'IL-12 devrait permettre d'identifier l'ensemble des similitudes et des différences entre ces deux activations, afin d'améliorer la manipulation des fonctions effectrices des différents sous-types de cellules NK en réponse aux diverses cytokines activatrices. De plus, l'établissement de signatures transcriptionnelles regroupant plusieurs gènes associés à l'activation des cellules NK par l'une ou l'autre de ces activations nous permettra d'identifier des cellules NK exposées à ces cytokines en contexte tumoral, à partir de données transcriptomiques i) publiques (analyse des données extraites du TCGA) ou ii) de cellules NK directement isolées de tumeurs fraîches par cytométrie en flux que nous allons prochainement générer.

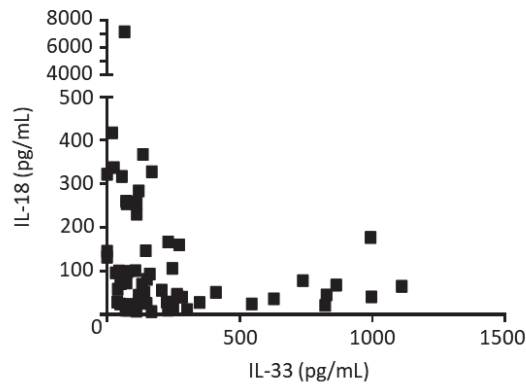


Figure complémentaire 3. L'expression d'IL-33 et l'expression d'IL-18 semblent exclusives dans les tumeurs du sein

Analyse de la concentration d'IL-33 et d'IL-18 dans les surnageants issus de la dilacération de tumeurs du sein par la technique de dosage multiparamétrique par électrochimiluminescence MSD.

2. La synergie avec d'autres cytokines

Nos résultats ont également montré que d'autres cytokines synergisent avec l'IL-33 pour induire la production d'IFN- γ par les cellules NK, bien que dans une moindre mesure par rapport à l'IL-12 (par ordre décroissant : l'IL-2, l'IL-15 et l'IFN- α). De manière frappante, l'expression de ST2 induite en réponse à ces cytokines corrèle avec les taux d'IFN- γ produits, à l'exception de l'IL-2 qui induit une expression plus faible de ST2 (**Figure complémentaire 4**) mais la sécrétion de grandes quantités d'IFN- γ . Ceci peut s'expliquer par une capacité plus forte de l'IL-2 à induire la production d'IFN- γ par les cellules NK par rapport à l'IL-15 (Becknell and Caligiuri, 2005). D'autre part, dans un modèle murin de cancer du sein, le TNF- α produit par les macrophages en contexte tumoral induit également l'expression de ST2 sur les cellules NK, favorisant ainsi une réponse anti-tumorale efficace (Qi et al., 2020a). Toutefois, nous n'avons pas confirmé ce résultat pour les cellules NK humaines.

La coopération de l'IL-33 avec l'IL-12 est en partie dépendante de la voie STAT-4. Ainsi, pour ces autres cytokines qui activent STAT-5 pour l'IL-2 et l'IL-15 (Liao et al., 2011) ; STAT-1/2 pour IFN- α (Platanias, 2005) et STAT-3/STAT-5b pour le TNF- α (Miscia et al., 2002), les voies de signalisation et les facteurs impliqués dans la régulation de ST2 restent encore à identifier.

Enfin, nous nous sommes également intéressés à l'IL-23. En effet, cette cytokine appartient à la famille de l'IL-12 et est formée d'un hétérodimère entre la chaîne p40 commune avec l'IL-12 et la chaîne p19. Elle est sécrétée en contexte infectieux (Yannam et al., 2012) et tumoral (Sheng et al., 2018; Yan et al., 2018; Neurath, 2019; Kansara et al., 2019) où elle active les cellules NK, seule ou en synergie avec l'IL-18 (van de Wetering et al., 2009; Ziblat et al., 2017). Ainsi, il nous a paru important de caractériser l'effet de l'IL-23 sur la régulation de la réponse des cellules NK humaines à l'IL-33. De manière intéressante, en contexte tumoral, il semblerait qu'il existe une balance entre l'IL-12 protectrice et l'IL-23 délétère (Yan et al., 2018). Nos résultats préliminaires *in vitro* montrent que contrairement à l'IL-12, l'IL-23 ne sensibilise pas les cellules NK humaines à répondre à l'IL-33 (résultats non présentés). Cette différence pourrait s'expliquer par l'induction de voies de signalisation différentes par les récepteurs propres à ces deux cytokines. En effet, l'IL-23 se fixe sur un récepteur composé d'une chaîne IL-12R β 1 commune avec l'IL-12 et d'une chaîne spécifique IL-23R qui recrute un hétérodimère STAT-3/STAT-4, alors que la signalisation en aval du récepteur de l'IL-12 (IL-12R β 1/ IL-

12Rβ2) est uniquement dépendante de STAT-4. Ces données restent à approfondir et éventuellement à élargir à d'autres membres de la famille de l'IL-12 (IL-27, IL-35, et IL-39), mais elles semblent révéler que l'effet de l'IL-12 sur l'expression de ST2 et la réponse à l'IL-33 dans les cellules NK sont spécifiques et non partagés avec d'autres membres de la même famille.

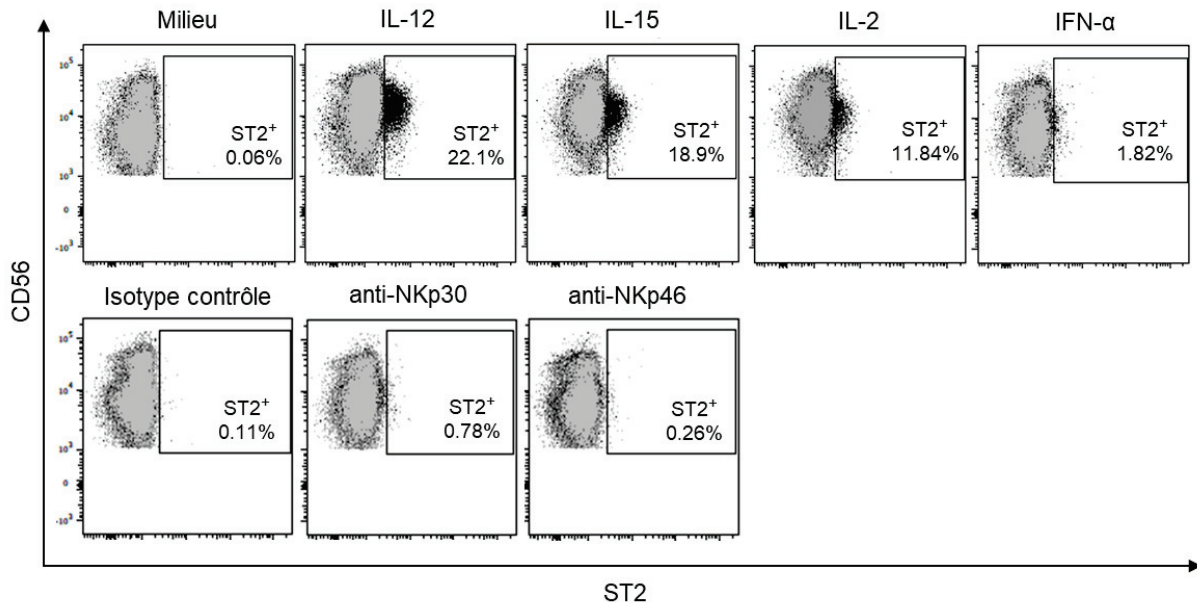


Figure complémentaire 4. L'expression de ST2 est induite à la surface des cellules NK en réponse à l'IL-12, l'IL-15, l'IL-2 et très faiblement en réponse à l'IFN-α

Analyse de l'expression de ST2 à la surface des cellules NK humaines activées pendant 24hrs en présence de milieu, d'IL-12 (10ng/mL), d'IL-15 (10ng/mL), d'IL-2 (500UI/mL), d'IFN-α (500UI/mL) ou d'anticorps contrôle (1μg/mL), anti-NKp30 (1μg/mL) ou anti-NKp46 (1μg/mL).

II. Les cellules NK ST2⁺ : identification d'une nouvelle sous-population ?

1. Les cellules NK CD56^{bright} ne répondent pas à l'IL-33

A travers nos résultats, l'expression de ST2 et donc l'activation des cellules NK par l'IL-33 est restreinte à une sous-population de cellules NK CD56^{dim}. Toutefois, nous avons pu observer l'activation anecdotique de certaines cellules NK CD56^{bright} en réponse à l'IL-33, représentant moins de 5% de la population totale pour la production d'IFN-γ et en quantités de plus de 20 fois inférieures comparé à la production de cytokines (IFN-γ, CCL3, CCL4 et CCL5) par les cellules NK CD56^{bright} en réponse à l'IL-18. Nous avons également observé la prolifération d'une partie des cellules NK CD56^{bright} en réponse à l'IL-33 combinée à l'IL-12, mais de manière très faible par rapport aux autres activations testées. La différenciation des cellules NK CD56^{bright} en cellules NK CD56^{dim} est un phénomène dynamique, donnant naissance à des cellules NK intermédiaires caractérisées par un phénotype mixte CD56^{bright} CD16⁺. Lors du tri cellulaire, seule l'utilisation du marqueur CD16 en association avec le marqueur CD56 permet de séparer ces cellules des véritables cellules NK CD56^{bright} CD16⁻, menant ainsi à 3 sous-

populations de cellules NK (**Figure complémentaire 5**). L'absence du marqueur CD16 dans les tris cellulaires que nous avons réalisés en début de ma thèse ne permet pas d'éliminer les cellules NK CD16⁺ dans la fraction CD56^{bright} et pourrait expliquer cette activation anecdotique observée parmi les cellules NK CD56^{bright}.

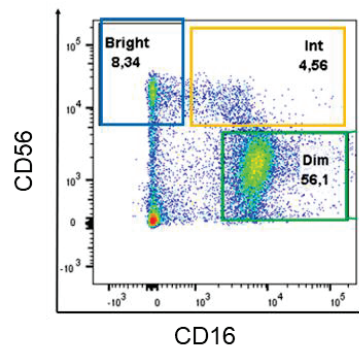


Figure complémentaire 5. Mise en évidence d'une population intermédiaire de cellules NK CD56^{bright} CD16⁺

Analyse de l'expression de CD56 et CD16 sur les cellules NK humaines par cytométrie en flux.

Par ailleurs, de nombreux articles de la littérature ainsi que nos propres observations font l'état d'une augmentation de l'expression de CD56 sur les cellules NK CD56^{dim} en réponse à l'activation par l'IL-12, qui peut également compliquer la distinction entre les différentes sous-populations (**Figure complémentaire 6**). Ainsi, ce phénomène peut rendre difficile la séparation des cellules NK CD56^{bright} et CD56^{dim} dans nos analyses où les cellules ne sont pas triées mais distinguées *a posteriori* sur la base de l'expression du CD56.

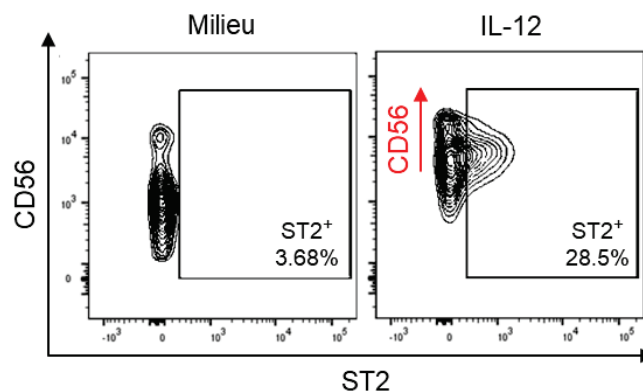


Figure complémentaire 6. Mise en évidence de l'augmentation du niveau d'expression de CD56 à la surface des cellules NK en réponse à l'IL-12

Analyse de l'expression de CD56 et ST2 à la surface des cellules NK activées en présence de milieu ou d'IL-12 (10ng/mL) pendant 24hrs.

En conclusion, de manière générale, nous considérons que les cellules NK CD56^{bright} ne répondent pas à l'IL-33 en contexte dépendant de l'IL-12.

2. Profil transcriptionnel unique des cellules NK ST2⁺

De manière reproductible, seulement une partie des cellules NK CD56^{dim} (20 à 30%) sont capables d'exprimer ST2 en réponse à une stimulation par l'IL-12, soulignant une hétérogénéité au sein de cette population. En effet, plusieurs équipes ont décrit de manière concomitante l'existence de sous-populations intermédiaires parmi les cellules NK CD56^{dim}, identifiées sur l'absence d'expression de CD57 et des KIRs (Lopez-Vergès et al., 2010), associée au maintien de l'expression de NKG2A (Björkström et al., 2010) ou caractérisées par l'expression élevée de CD94 et une activité hautement polyfonctionnelle (production d'IFN- γ et cytotoxicité) (Yu et al., 2010), ou par l'expression de CD62L (Juelke et al., 2010) ou de CX3CR1 (Hamann et al., 2011). Plus récemment, l'analyse épigénétique et transcriptionnelle de cellules NK humaines a identifié les cellules NK CD56^{dim} CD57⁻ comme une sous-population phénotypiquement et fonctionnellement intermédiaire entre les cellules NK CD56^{bright} CD16⁻ et les cellules NK CD56^{dim} CD57⁺ terminalement différenciées et cytotoxiques (Collins et al., 2019). Toutefois, l'analyse par cytométrie en flux de ces molécules ne nous a pas permis d'identifier un marqueur exprimé par l'ensemble des cellules NK ST2⁺ et restreint à ces dernières. Ceci pourrait s'expliquer par l'existence de plusieurs sous-populations distinctes parmi les cellules NK CD56^{dim} mais également par une régulation concomitante et dynamique de l'ensemble de ces marqueurs au cours de la différenciation des cellules NK (Fauriat et al., 2010). Nous avons donc trié par cytométrie en flux 8 sous-populations de cellules NK en fonction de leur expression des marqueurs CD56, CD16, CD57 et ST2 afin d'évaluer de manière non supervisée par RNA-seq leur profil transcriptionnel et d'identifier une signature de gènes propres aux cellules NK ST2⁺. Les résultats de cette analyse seront discutés dans les paragraphes ci-dessous.

2.1. Définition de la signature transcriptomique des cellules NK ST2⁺

L'analyse du profil transcriptionnel des populations triées par cytométrie en flux nous a permis de confirmer l'identité de ces dernières, avec une expression forte des gènes précédemment identifiés comme spécifiques des cellules NK CD56^{bright} (*NCAM1*, *SELL*, *CCR7*, *CCR5*, *CXCR3*, *KLRC1*, *KLRC2*, *KIT*, *TCF7*, *LEF1*, *BACH2*) ou des cellules NK CD56^{dim} (*CX3CR1*, *CXCR2*, *FCGR3A*, *KIR2DL1*, *KIR2DL3*, *KIR3DL1*, *KIR3DL2*, *PRMD1*, *ZEB2*, *MAF*, *NFIL3*) dans ces sous-populations respectivement. Nous avons émis l'hypothèse que l'expression de ST2 définit une sous-population distincte au sein des cellules NK CD56^{dim}. L'analyse en composante principale confirme que l'expression de ST2 seule est suffisante pour ségréger les cellules NK ST2⁺ des cellules NK CD56^{dim} ST2⁻ et ce plus particulièrement pour les cellules ST2⁺ CD57⁻. En effet, nous avons identifié un ensemble de gènes spécifiquement sur-exprimés (DEG, Differentially Expressed Genes) dans les cellules NK ST2⁺ par rapport aux deux sous-populations de cellules NK CD56^{bright} et CD56^{dim} cultivées en IL-12. En comparant les sous-populations activées en IL-12, nous avons ainsi éliminé de l'analyse tous les gènes dont la régulation est dépendante de l'IL-12 dans les 3 sous-populations et mis en évidence des spécificités intrinsèques à chaque sous-population de cellules NK. L'analyse de l'ensemble des gènes spécifiquement sur-exprimés dans les cellules NK ST2⁺ (indépendamment de l'expression de CD57) par rapport aux cellules NK CD56^{bright} et CD56^{dim} ST2⁻ nous a permis d'établir une signature transcriptionnelle (234 gènes) spécifique des cellules NK ST2⁺, comprenant des gènes codant des protéines membranaires (*IL23R*, *TRPV1*, *IL1RL1*, *ITGA3*, *ULBP1*, *ICAM1*), des protéines sécrétées (*VEGFA*, *GZMA*, *IFNG*) ou des facteurs de transcription (*DMRTA*, *E2F2*, *E2F1*); dont certains ont été précédemment décrites comme associées à la maturation, la prolifération ou l'activation des cellules NK. En outre, nous avons également confirmé à l'échelle transcriptionnelle l'expression spécifique de *ST2* (*IL1RL1*) dans les cellules NK ST2⁺ triées par cytométrie en flux sur la

base de l'expression de surface de ce récepteur. Nous souhaitons désormais valider à l'échelle protéique la spécificité des marqueurs identifiés dans cette signature ST2⁺ ; par cytométrie en flux pour les protéines de surface, par dosages pour les protéines secrétées et par western blot pour les protéines intracellulaires avant d'étudier leur rôle dans la régulation de la biologie des cellules NK ST2⁺. Plus particulièrement, nous avons identifié le gène *IL23R* codant la sous-unité IL-23R du récepteur à l'IL-23, ainsi il serait intéressant d'évaluer les effets de l'IL-23 sur les fonctions effectrices des cellules NK ST2⁺. D'autre part, le gène *VEGFA* codant la protéine pro-angiogénique VEGF, est l'un des gènes les plus spécifiquement sur-exprimé dans les cellules NK ST2⁺. Ce facteur soluble, historiquement associé à l'induction de la néo-angiogénèse, a également été décrit en tant que marqueur spécifique des cellules NK utérines et jouerait un rôle essentiel dans le remodelage des tissus endothéliaux au cours de la placentation (Hanna et al., 2006). Cette observation pose la question quant à la fonction de ce facteur soluble dans les cellules NK ST2⁺ : permet-il de faciliter l'extravasation des cellules NK CD56^{dim} ST2⁺ depuis le sang vers les tissus périphériques ?

Par ailleurs, des analyses d'enrichissement de voies biologiques en utilisant la base de données MSigDB (Molecular Signatures Database) (<https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/collections.jsp>) (Gene Ontology, KEGG, Hallmark) sont en cours afin d'identifier les voies enrichies dans les cellules NK ST2⁺. Nous sommes également en train d'évaluer l'accessibilité de la chromatine au niveau des locis des 10 gènes les plus significativement surexprimés spécifiquement dans les cellules NK ST2⁺ grâce à une analyse ATACseq que nous avons réalisée en parallèle sur les mêmes échantillons que ceux utilisés pour le RNAseq. Cette analyse nous permettra également de déterminer des zones remaniements de la chromatine spécifiques des cellules NK ST2⁺ par rapport aux autres populations de cellules NK CD56^{bright} et CD56^{dim} cultivées en IL-12.

En conclusion, cette signature permet pour la première fois de mettre en évidence des marqueurs associés uniquement aux cellules NK ST2⁺ et dont l'analyse (par RNAseq, RT-qPCR, cytométrie en flux ou western blot) sera utile pour distinguer de manière robuste la sous-population exprimant ST2 au sein des cellules NK totales. La capacité d'identifier précisément des sous-populations de cellules NK dotées de caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles spécifiques présente aujourd'hui un intérêt majeur pour améliorer le ciblage ou l'expansion de ces cellules en contexte pathologique.

2.2. Les cellules NK ST2⁺ : sous-population intermédiaire au cours de la différenciation des cellules NK CD56^{bright} vers CD56^{dim}

L'analyse non supervisée de l'ensemble des DEG entre les cellules NK ST2⁺ et les cellules NK CD56^{bright} d'une part et entre les cellules NK ST2⁺ et les cellules NK CD56^{dim} d'autre part nous a permis de mettre en évidence un ensemble de gènes fortement exprimés dans les cellules NK ST2⁺, partagés avec les cellules NK CD56^{bright} et progressivement perdus au cours de leur différenciation vers les cellules NK CD56^{dim} ST2⁺ tandis que d'autres sont communs avec les cellules NK CD56^{dim} et progressivement acquis au cours de la différenciation des cellules NK CD56^{dim} ST2⁺ vers les cellules NK CD56^{dim} CD57⁺ terminalement différenciées. Ces observations soulignent le statut intermédiaire de la population de cellules NK ST2⁺ par rapport aux populations prototypiques de cellules NK CD56^{bright} et CD56^{dim}, pouvant ainsi expliquer sa polyfonctionnalité.

Les cellules NK $CD56^{dim}$ peuvent s'engager dans une voie de différenciation terminale, caractérisée par l'acquisition de l'expression de CD57 et la perte de leurs capacités sécrétrices au profit d'une activité cytotoxique accrue (Lopez-Vergès et al., 2010; Björkström et al., 2010; Collins et al., 2019). Malgré un enrichissement en cellules $CD57^-$ parmi les cellules NK $ST2^+$, nous avons également observé des cellules NK $ST2^+ CD57^+$, suggérant que ces deux marqueurs ne sont pas complètement exclusifs au cours de la différenciation. De manière intéressante, les cellules NK $ST2^+ CD57^-$ présentent un profil d'expression génique plus proche des cellules NK $CD56^{bright}$, tandis que le profil des cellules NK $ST2^+ CD57^+$ ressemble davantage à celui des cellules NK $CD56^{dim} CD57^-$. Ces observations suggèrent que les cellules NK $ST2^+ CD57^+$ correspondent à un état plus terminalement différencié que les cellules NK $ST2^+ CD57^-$. Ainsi, nous émettons l'hypothèse que l'expression de ST2 est acquise par les cellules NK $CD56^{dim}$ précocément au cours de leur différenciation puis est ensuite perdue au cours de la différenciation tardive, et ce de manière concomitante avec l'acquisition de l'expression des marqueurs CD57 et KIRs. Ainsi, les cellules NK $ST2^+$ pourraient alternativement acquérir l'expression de CD57 après ou avant la perte d'expression de ST2, générant ainsi des cellules NK $ST2^+ CD57^-$ ou $ST2^+ CD57^+$ respectivement. Cette hypothèse serait en accord avec le modèle proposé par Björkström *et al.* (**Figure complémentaire 7**), selon lequel l'expression des marqueurs NKG2A, CD57 et KIRs est régulée de manière concomitante et stochastique au cours de la différenciation des cellules NK $CD56^{bright}$ en cellules NK $CD56^{dim}$, générant ainsi un panel de cellules intermédiaires présentant un phénotype mixte pour ces marqueurs (Björkström et al., 2010).

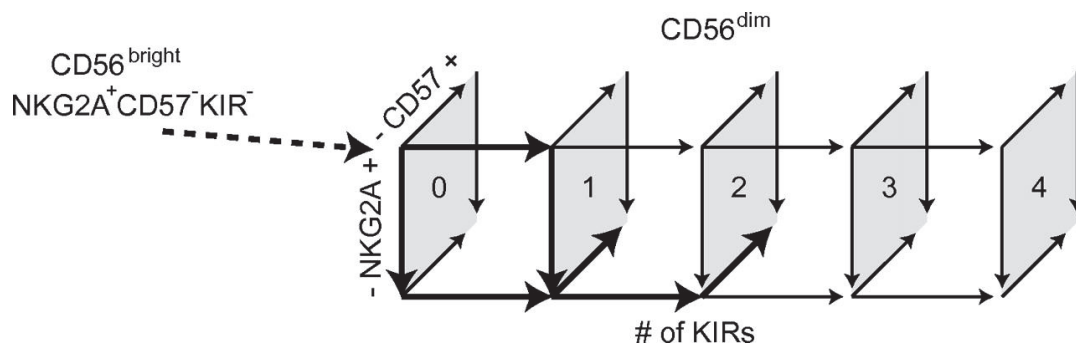


Figure complémentaire 7. Modèle de régulation de l'expression des marqueurs CD57, NKG2A et KIRs à la surface des cellules NK au cours de la différenciation

Figure extraite de (Björkström et al., 2010). Au cours de leur différenciation, les cellules NK $CD56^{bright}$ vont progressivement perdre l'expression de NKG2A et acquérir l'expression de CD57 et d'un ensemble de KIRs. L'expression de ces marqueurs étant régulée de manière concomitante, Björkström et al. présentent un modèle d'acquisition stochastique de ces 3 marqueurs, expliquant ainsi la génération de cellules $CD56^{dim}$ intermédiaires caractérisées par une combinaison mixte de l'expression de ces trois marqueurs.

L'expression de CD94 (*KLRD1*) ainsi que de CD62L (*SELL*) a également été proposée comme caractéristique phénotypique d'une sous-population de cellules NK intermédiaires entre les cellules NK $CD56^{bright}$ et $CD56^{dim}$ (Yu et al., 2010; Juelke et al., 2010). Toutefois, de manière surprenante, nos données montrent une absence d'expression de ces deux marqueurs dans les cellules NK $ST2^+$ ($CD57^-$ ou $CD57^+$) (**Figure complémentaire 8**), suggérant que l'expression de CD94 et CD62L définit une sous-population intermédiaire de cellules NK $CD56^{dim}$ distincte des cellules NK $ST2^+$.

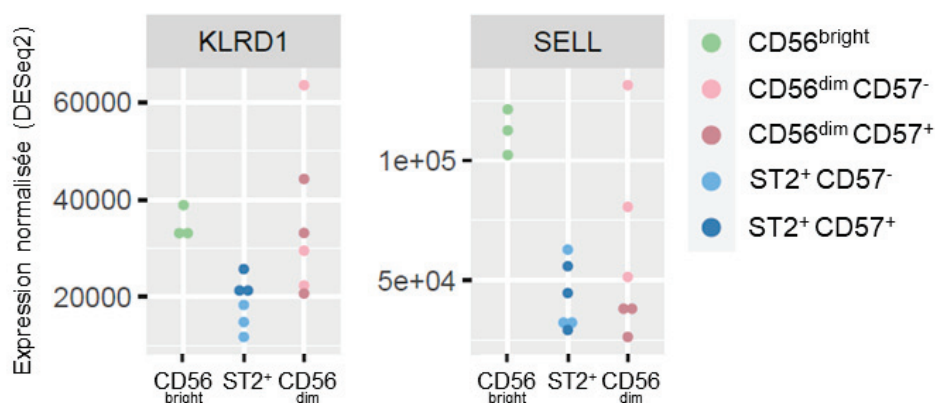


Figure complémentaire 8. Les gènes *KLRD1* (CD94) et *SELL* (CD62L) ne sont pas spécifiquement exprimés dans les cellules NK ST2⁺

Analyse du niveau d'expression normalisée des gènes *IL12RB1* et *IL12RB2* dans les sous-populations de cellules NK humaines (données issues de l'analyse par RNAseq).

2.3. Ontogénie des cellules NK ST2⁺

L'identification des voies de différenciation régulant le développement des différentes sous-populations de cellules NK est un paramètre crucial si l'on veut pouvoir tirer profit des différentes caractéristiques propres à chacune. Ainsi, un ensemble de facteurs de transcription ont été associés au maintien des programmes transcriptionnels et épigénétiques propres aux cellules NK CD56^{bright} (*TCF7*, *LEF1*, *BACH2*) et CD56^{dim} (*PRDM1*, *ZEB2*, *NFIL3*, *MAF*) respectivement (Bezman et al., 2012; Schlums et al., 2015; Tesi et al., 2016; Lau et al., 2018; Collins et al., 2019). De manière frappante, l'analyse non supervisée des données de RNA-seq montre qu'aucun des gènes codants les facteurs de transcription précédemment décrits comme spécifiques des cellules NK CD56^{bright} (*BACH2*, *TCF7*, *LEF1*) ne sont exprimés dans les cellules NK ST2⁺ tandis que les gènes codants les facteurs de transcription régulant les cellules NK CD56^{dim} (*MAF*, *NFIL3*, *PRDM1*, *TBX21*, *ZBTB16*, *ZEB2*) présentent un niveau d'expression intermédiaire dans les cellules NK ST2⁺. Ces résultats soulignent ainsi l'appartenance des cellules NK ST2⁺ à la sous-population des cellules NK CD56^{dim}, correspondant à un état transitoire de différenciation dont le programme transcriptionnel est contrôlé par les mêmes facteurs de transcription que ceux précédemment décrits. Les résultats obtenus à ce jour ne nous permettent pas d'identifier de manière formelle les facteurs de transcription à l'origine de la différenciation des cellules NK ST2⁺ mais cet axe pourrait être investigué en réalisant une analyse de sc-RNAseq sur ces même sous-populations. De manière intéressante, nous avons observé que l'expression des gènes codant les facteurs de transcription *BACH2* et *TCF7* est spécifiquement perdue dans les cellules NK ST2⁺, suggérant que la perte d'expression de ces facteurs de transcription peut correspondre à un signal induisant la différenciation des cellules CD56^{bright} en cellules NK CD56^{dim} ST2⁺. Par ailleurs, l'expression du facteur de transcription *NFIL3* est plus élevée dans les cellules NK ST2⁺ CD57⁺ et

CD56^{dim} CD57⁻ par rapport à toutes les autres sous-populations analysées, suggérant un potentiel rôle de ce facteur de transcription dans la régulation de l'expression de ST2 au cours de la différenciation des cellules NK CD56^{dim} ST2⁻.

2.4. Régulation de l'expression de ST2 par l'axe IL-12/STAT-4

Nous montrons que l'induction de ST2 en réponse à l'IL-12 dans les cellules NK CD56^{dim} humaines est dépendante de la phosphorylation de STAT-4, comme décrit pour les lymphocytes Th1 chez la souris (Baumann et al., 2015). Par ailleurs, nous avons observé que l'intégralité des cellules NK CD56^{bright} sont capables de répondre à l'IL-12 en phosphorylant STAT-4 tandis que seulement la moitié des cellules NK CD56^{dim} sont sensibles à cette stimulation (**Figure complémentaire 9**). Cette hétérogénéité de réponse à l'IL-12 dans les cellules NK CD56^{dim} a également été mise en évidence à travers l'étude de Yu *et al.* qui montre que les cellules NK CD56^{dim} CD94^{fort} sont caractérisées par une capacité accrue à activer la voie STAT-4 en réponse à l'IL-12 par rapport aux autres cellules NK CD56^{dim} CD94^{faible} (Yu et al., 2010). Ainsi, deux questions émergent de ces observations : Pourquoi les cellules NK CD56^{bright} qui répondent très fortement à l'IL-12 en phosphorylant STAT-4 n'expriment pas ST2 ? Et quels sont les mécanismes régulant la réponse à l'IL-12 dans les cellules NK CD56^{dim} ?

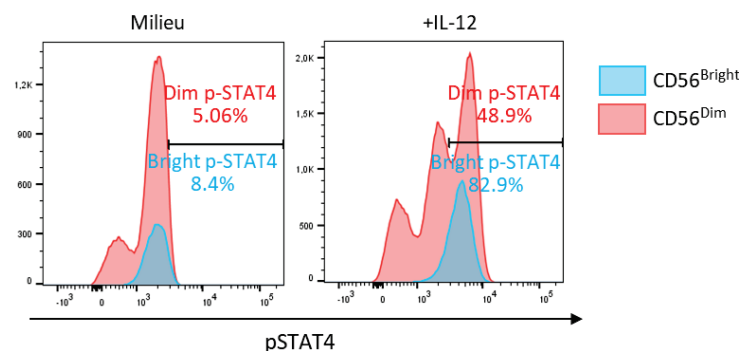


Figure complémentaire 9. L'activation de la voie STAT-4 en réponse à l'IL-12 est différente dans les cellules NK CD56^{bright} et CD56^{dim} humaines

Analyse de l'expression de phospho-STAT-4 dans les cellules NK CD56^{bright} et CD56^{dim} activées en présence de milieu ou d'IL-12 (10ng/mL) pendant 5 minutes.

2.4.1. Régulation de l'axe IL-12/STAT-4 dans les cellules NK CD56^{bright}

Bien que la totalité des cellules NK CD56^{bright} répondent à l'IL-12 en phosphorylant STAT-4 (**Figure complémentaire 9**), elles n'expriment jamais ST2 dans les conditions évaluées, *i.e.* en réponse à l'IL-12. Ces résultats suggèrent donc un blocage en aval de l'activation de STAT-4 dans ces cellules. Plusieurs mécanismes peuvent limiter l'expression d'un gène cible malgré l'activation des voies de signalisation régulant son expression. Ces mécanismes peuvent être de nature épigénétique, via l'induction de méthylations de la chromatine (marques répressives de type H3K9me3 ou H3K27me3) ou par une modification de l'accessibilité de la chromatine (inaccessibilité d'une région activatrice ou ouverture

d'une région répressive) ; ou de nature transcriptionnelle via la modification de l'expression de facteurs de transcriptions ou de miRNA qui régulent l'activation de gènes cibles. Une littérature florissante fait l'état d'importants remaniements épigénétiques et transcriptionnels au cours de la différenciation des cellules NK CD56^{bright} en cellules NK CD56^{dim} (Hanna et al., 2004; Wendt et al., 2006; Crinier et al., 2018; Collins et al., 2019). Ainsi, nous émettons l'hypothèse que l'incapacité des cellules NK CD56^{bright} à exprimer ST2 repose sur leur programme transcriptionnel et épigénétique unique. Bien que de nombreux facteurs de transcription et gènes spécifiques des cellules NK CD56^{bright} ont été rapportés, il nous est impossible de conclure à ce jour sur l'identité des facteurs bloquant l'expression de ST2 dans ces cellules. Toutefois, Collins *et al* ont montré que le facteur de transcription BACH2 réprime les phénotypes effecteurs associés aux cellules NK CD56^{dim} humaines (Collins et al., 2019). Nos résultats montrent que l'expression de *BACH2* est spécifiquement perdue dans les cellules ST2⁺, suggérant que BACH2 pourrait être un bon candidat pour expliquer la régulation négative de l'expression de ST2 dans les cellules NK CD56^{bright}.

2.4.2. Régulation de l'axe IL-12/STAT-4 dans les cellules NK CD56^{dim}

La réponse hétérogène des cellules NK CD56^{dim} à l'IL-12 suggère une expression différentielle du récepteur à l'IL-12 au sein de cette sous-population. Notre analyse transcriptionnelle montre que l'expression d'*IL12RB2* codant la sous-unité $\beta 2$ du récepteur à l'IL-12 est graduelle, avec une expression très forte dans les cellules NK CD56^{bright}, intermédiaire dans les cellules NK ST2⁺ CD57⁻ puis ST2⁺ CD57⁺ et faible dans les cellules NK CD56^{dim} CD57⁻ puis CD56^{dim} CD57⁺. Nous émettons donc l'hypothèse que l'absence de réponse à l'IL-12 dans les cellules NK CD56^{dim} terminalement différenciées s'expliquerait par la perte d'expression de la sous-unité $\beta 2$ du récepteur à l'IL-12 sur ces cellules. De manière paradoxale, l'expression relative du gène *IL12RB1* codant la sous-unité $\beta 1$ semble plus forte dans les cellules NK CD56^{dim} et les cellules NK ST2⁺ par rapport aux cellules NK CD56^{bright} qui présentent les niveaux d'expression les plus faibles. Toutefois, cette augmentation d'expression d'*IL12RB1* pourrait correspondre à un mécanisme de régulation positive de ce gène en compensation de la perte d'expression d'*IL12RB2*. Malheureusement, nous n'avons pas réussi à mettre au point les marquages par cytométrie en flux des récepteurs de l'IL-12 (IL-12R $\beta 1$ et IL-12R $\beta 2$) pour confirmer les différences observées au niveau transcriptionnel. Ce problème a également été rencontré dans l'équipe de Giorgio Trinchieri (NIH/NCI, Bethesda) avec qui nous avons échangé à ce propos.

En conclusion, nos résultats d'analyse transcriptomique renforcent les résultats obtenus *in vitro* identifiant les cellules NK ST2⁺ comme une sous-population intermédiaire et polyfonctionnelle.

Toutefois, un ensemble de questions subsistent à ce jour : Quels sont les facteurs responsables du blocage de l'expression de ST2 en aval de la voie STAT-4 dans les cellules NK CD56^{bright} ? Est-ce que l'ensemble des cellules NK CD56^{bright} sont programmées pour exprimer ST2 au cours de leur différenciation ou ce programme est-il restreint à une sous-population de cellules CD56^{bright} détenant un potentiel pour l'expression de ST2 lorsqu'elles se différencient ? Les cellules NK ST2⁺ sont-elles réellement les précurseurs des cellules NK CD56^{dim} ST2⁻ ou les deux sous-populations sont-elles en réalité distinctes et non affiliées ?

Comme déjà mentionné précédemment, des analyses de sc-RNA-seq permettront potentiellement de répondre à ces questions. Par ailleurs, l'utilisation de l'outil Monocle qui permet d'établir un *continuum* entre différentes sous-populations en identifiant de manière non-supervisée les plus infimes variations dans l'expression de gènes ou des événements d'ouverture et de fermeture de la chromatine entre les cellules pour les ordonner en fonction d'une échelle de « pseudo-temps » (Trapnell et al., 2014) pourrait permettre de répondre aux questions relatives à l'ontogénie des cellules NK ST2⁺ et de leur devenir au cours de la différenciation.

Partie 2 : L'IL-33, actrice de l'immunité anti-tumorale ?

Nos résultats montrent que la réponse à l'IL-33 est inductible dans les cellules NK permettant ainsi l'activation de leurs fonctions effectrices anti-tumorales. Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que l'IL-33 pourrait être impliquée dans l'immunosurveillance des tumeurs via l'activation des cellules NK. Cette hypothèse sera discutée dans cette partie.

I. Expression nucléaire d'IL-33 en contexte tumoral : quelle relevance physiologique ?

1. Expression nucléaire d'IL-33 dans les cellules stromales

Une des particularités de l'IL-33 réside dans son expression nucléaire constitutive et majoritairement restreinte aux cellules non-hématopoïétiques (cellules endothéliales, épithéliales dans les tissus barrières ou stromales non-immunitaires).

Nous avons identifié par immunohistochimie sur coupes de tumeurs du sein un fort signal nucléaire dans les cellules qui constituent les vaisseaux intratumoraux, en accord avec les premières études identifiant l'IL-33 comme fortement exprimée dans les cellules endothéliales (Moussion et al., 2008). Ainsi, ces cellules constituent une source majeure d'IL-33 dans les tissus et par conséquent dans les tumeurs. La perte d'IL-33 nucléaire dans les cellules endothéliales a été observée *in vitro* en réponse à des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β) ou des facteurs pro-angiogéniques (VEGF) et *in situ* dans les vaisseaux intra-tumoraux observés sur des coupes de tumeurs du colon, du sein ou du rein; et a été associée au processus de néo-angiogenèse (Küchler et al., 2008; Maywald et al., 2015). Nous n'avons pas observé ce phénomène sur les coupes de tumeurs du sein. Toutefois, nous avons observé la perte d'expression d'IL-33 dans le noyau des vaisseaux intra-tumoraux dans le cancer de la tête et du cou (**Figure complémentaire 10**).

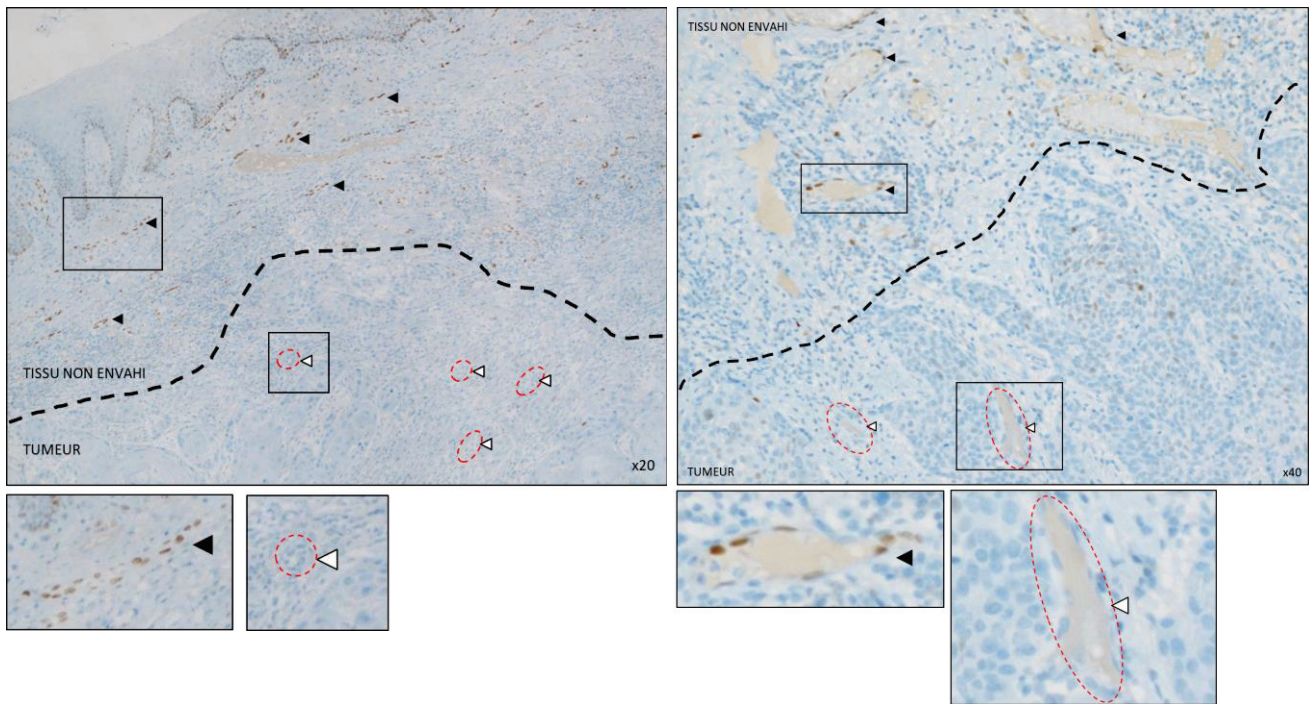


Figure complémentaire 10. L'IL-33 n'est pas exprimée dans les cellules endothéliales des vaisseaux intra-tumoraux observés dans les tumeurs de la tête et du cou

La ligne pointillée représente le front d'invasion de la tumeur. Les flèches noires indiquent les vaisseaux IL-33⁺ dans le tissu sain et les flèches blanches indiquent les vaisseaux IL-33⁻ dans la tumeur. Les pointillés rouges délimitent les vaisseaux sanguins. Les rectangles noirs délimitent les zones qui ont été agrandies.

Nous avons également observé une expression nucléaire d'IL-33 dans des cellules stromales isolées, dont la morphologie semble évoquer celle de fibroblastes dans les cancers du sein et de la tête et du cou. En lien avec cette observation, l'expression d'IL-33 a été retrouvée dans les fibroblastes associés aux tumeurs de la tête et du cou (Chen et al., 2013), gastriques (Su et al., 2015) ainsi que dans les cancers colorectaux (Cui et al., 2015; Landskron et al., 2019). Enfin, nous avons également observé une expression nucléaire d'IL-33 dans des cellules isolées du stroma qui présentent une morphologie rappelant celle de cellules immunitaires infiltrant les tumeurs. En accord avec cette observation, l'expression d'IL-33 a également été observée dans le noyau de cellules stromales mononucléées pouvant correspondre à des cellules immunitaires dans les cancers du côlon (Landskron et al., 2019). De manière intrigante, nous avons également noté une expression nucléaire d'IL-33 dans les acini mammaires non tumoraux à proximité de la tumeur, restreinte à des cellules en périphérie des canaux mammaires qui pourraient correspondre à des myofibroblastes ou des cellules myoépithéliales. L'expression de l'IL-33 dans les myofibroblastes a été rapportée en contexte d'inflammation pulmonaire (Kotsiou et al., 2018), intestinale (Sponheim et al., 2010; Kobori et al., 2010) ou pancréatique (Masamune et al., 2010; Nishida et al., 2010) ; et serait impliquée dans le phénomène de fibrose. En outre, les cellules endothéliales constituant les vaisseaux de type HEV ou les cellules fibroblastiques de type FRC sont particulièrement enrichies dans les tumeurs au niveau des structures lymphoïdes tertiaires ou TLS (Dieu-Nosjean et al., 2016). Ces cellules, exprimant l'IL-33 nucléaire de manière constitutive, pourraient ainsi correspondre à une source importante d'IL-33 dans les tumeurs, en contact direct avec des nombreuses cellules immunitaires présentes dans ces structures lymphoïdes ectopiques (Baekkevold et al., 2003)

L'utilisation de techniques de marquages par immunofluorescence multiple (technologie OPAL par exemple) devrait permettre l'identification de ces cellules stromales exprimant l'IL-33 de manière nucléaire en contexte tumoral; paramètre essentiel si l'on veut appréhender leur rôle dans cette pathologie.

2. Expression nucléaire d'IL-33 dans les cellules tumorales

Contrairement aux cellules épithéliales mammaires normales, nous n'avons pas observé d'expression d'IL-33 nucléaire dans les cellules tumorales sur coupes de tumeurs du sein. Ces résultats sont contradictoires avec ce qui a été décrit dans les cancers du côlon et des intestins (Maywald et al., 2015; Mertz et al., 2016), de la tête et du cou (Rössle et al., 2016) ou encore du sein paradoxalement (Kim et al., 2015; Xiao et al., 2016). Ces différences peuvent être dues à l'utilisation d'anticorps ou de cohortes différentes d'une étude à une autre, mais peut également refléter une perte d'expression de l'IL-33 dans les cellules tumorales au cours de la tumorigenèse. En effet, notre analyse de la base de données transcriptomiques du TCGA montre une plus forte expression de l'ARNm codant l'IL-33 dans le tissu péri-tumoral par rapport au tissu tumoral, de manière significative dans 7 cancers sur 14 étudiés (*i.e.* vessie, sein, tête et cou, poumon, mélanome, estomac et thyroïde) et avec une tendance dans 3 autres cancers (*i. e.* foie, poumon, prostate). En accord avec cette observation, les taux d'IL-33 sont inversement corrélés au grade et à la taille de la tumeur dans les adénocarcinomes du poumon (Yang et al., 2018) et les ostéosarcomes (Koster et al., 2018). Ces observations ainsi que nos résultats sont en faveur d'un rôle anti-tumoral de l'IL-33 et identifient la perte d'IL-33 au cours de la tumorigenèse comme un potentiel mécanisme d'immuno-échappement non caractérisé à ce jour. En accord avec cette hypothèse, la perte d'IL-33 au cours de la tumorigenèse a été associée à une diminution de l'expression du CMH-1 sur les cellules tumorales favorisant ainsi l'échappement à la réponse immunitaire médiée par les LT CD8⁺ (Saranchova et al., 2016). Toutefois, dans d'autres études, l'expression d'IL-33 est plus forte dans le tissu tumoral par rapport au tissu normal dans les gliomes (Zhang et al., 2017a) et les cancers du rein de haut grade (Wang et al., 2016). Dans le cancer du côlon, l'expression d'IL-33 est absente du tissu non tumoral, induite dans les carcinomes de bas grade et précoces, et plus faible dans les carcinomes de haut grade et avancés. Ainsi, dans cette étude, l'augmentation de l'expression d'IL-33 au moment de l'initiation de la carcinogenèse a été associée à un rôle pro-tumoral de l'IL-33 (Mertz et al., 2016). Comme dans ces études, notre analyse des données du TCGA montre une augmentation significative de l'expression d'IL-33 dans la tumeur par rapport au tissu sain dans le gliome et le cancer du rein ainsi qu'une tendance similaire dans le cancer du côlon. Le rôle de l'IL-33 sur l'initiation et l'évolution de la tumorigenèse dépend donc probablement du contexte initial (*i.e.* niveau basal d'expression d'IL-33, infiltrat en cellules immunitaires et stromales, environnement cytokinique) propre à chaque organe et des différences peuvent être observées d'un type de cancer à un autre.

Toutefois, on peut se questionner sur la relevance physiologique d'un marquage nucléaire d'IL-33 sur coupes de tumeurs. En effet, le rôle d'alarmine d'IL-33 régulatrice de la réponse immunitaire en contexte tumoral est conditionné par la libération de l'IL-33 à partir du noyau des cellules qui l'expriment. La perte du signal nucléaire dans les cellules tumorales pourrait être interprétée comme le signe d'une libération d'IL-33 vers le milieu extra-cellulaire mais peut également refléter la perte d'expression de l'IL-33 au cours de la tumorigenèse. Il est donc difficile d'étudier le rôle de l'IL-33 en contexte tumoral uniquement à partir de ces marquages sur coupes de tumeurs qui doivent s'accompagner d'études fonctionnelles.

II. Libération de l'IL-33 au cours de la tumorigénèse

L'établissement d'une tumeur dans un tissu induit de nombreux stress tels que la contrainte mécanique (Kakkar et al., 2012; Chen et al., 2015), l'hypoxie, la diminution de la biodisponibilité des nutriments, la perte d'intégrité des vaisseaux sanguins (Küchler et al., 2008) ou encore la mort cellulaire immunogénique (Lüthi et al., 2009; Rickard et al., 2014; Rose et al., 2015; Shlomovitz et al., 2019), dont certains ont déjà été impliqués dans la libération d'IL-33. Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que la présence de stress cellulaires liés au développement tumoral pourrait induire la libération d'IL-33 dans le microenvironnement tumoral.

Un des arguments majeurs en faveur de cette hypothèse repose sur la détection de taux importants d'IL-33 soluble dans les surnageants que nous avons obtenus à partir de la dilacération de tumeurs du sein issues de résections chirurgicales. En accord avec cette donnée, il a été montré à partir de cellules isolées de patients atteints de cancer de l'estomac que le TNF- α produit par les cellules tumorales en EMT augmente l'expression et la libération d'IL-33 par les fibroblastes associés à la tumeur (Zhou et al., 2020). Nos résultats préliminaires de marquages par immunofluorescence sur coupes histologiques de tumeurs du sein montrent une expression cytoplasmique de l'IL-33 dans les macrophages (CD68⁺) ou les fibroblastes (Vimentine⁺) (**Figure complémentaire 11**). De même, nous avons observé la présence d'un marquage cytoplasmique de l'IL-33 dans des fibroblastes primaires isolés de tumeurs du sein obtenues après résection chirurgicale, associé à un signal de haut poids moléculaire en Western Blot (**Figures complémentaires 12 et 13**). La transfection d'un siRNA spécifiquement dirigé contre l'IL-33 nous a permis de valider la spécificité du marquage nucléaire en immunofluorescence et du marquage qui lui est associé en Western Blot (environ 36kDa) dans les fibroblastes isolés d'amygdales de donneurs sains (**Figure complémentaire 13A**). Toutefois, le marquage cytoplasmique observé dans les fibroblastes isolés de tumeurs et le signal de haut poids moléculaire en Western Blot qui lui est associé (environ 130kDa) ne sont pas perdus lorsque ces cellules sont transfectées avec le même siRNA (**Figure complémentaire 13B**). Ceci suggère que l'anticorps utilisé pour la détection de l'IL-33 (clone Nussy-1) reconnaît une protéine cytoplasmique de poids moléculaire d'environ 130kDa et qui ne correspond pas à l'IL-33 mature de poids moléculaire de 36kDa. A ce jour, nous ne sommes donc pas parvenus à valider la spécificité de ce marquage cytoplasmique de l'IL-33. Toutefois, de manière intéressante, une étude a récemment rapporté que l'IL-33 pouvait être libérée en association avec les histones, formant ainsi un complexe de très haut poids moléculaire (Travers et al., 2018), questionnant ainsi l'existence de formes complexées de l'IL-33 qui pourraient avoir une localisation subcellulaire et poids moléculaire différent de la forme mature ; et dont la stabilité pourraient être modifiée et induire une insensibilité aux approches de siRNA.

Enfin, l'IL-33 subit des modifications post-traductionnelles telles qu'une oxydation rapide dès sa libération dans le milieu extracellulaire (Cohen et al., 2015). Ce phénomène a fortement limité notre étude des mécanismes régulant sa sécrétion, et nos tentatives de bloquer ou de réverser cette oxydation sont restées vaines. Ainsi, de nombreuses limitations techniques rencontrées lors de ma première année de thèse ont freiné l'avancement de cet axe, et de nombreuses questions demeurent non résolues à ce jour.

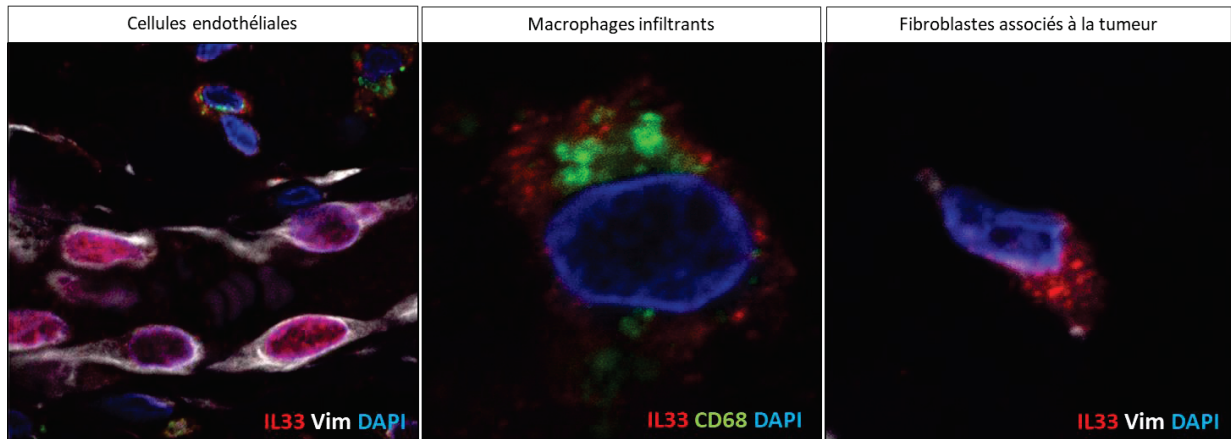


Figure complémentaire 11. Marquages de l'IL-33, de la vimentine et de CD68 obtenus par immunofluorescence sur coupes de tumeurs du sein

Les tumeurs ont été fixées en formol puis incluses en paraffine pour être sectionnées en coupes de 3µm d'épaisseur à l'aide d'un microtome afin d'analyser l'expression d'IL-33 dans les cellules endothéliales (Vimentine⁺), les macrophages (CD68⁺) et les fibroblastes (Vimentine⁺).

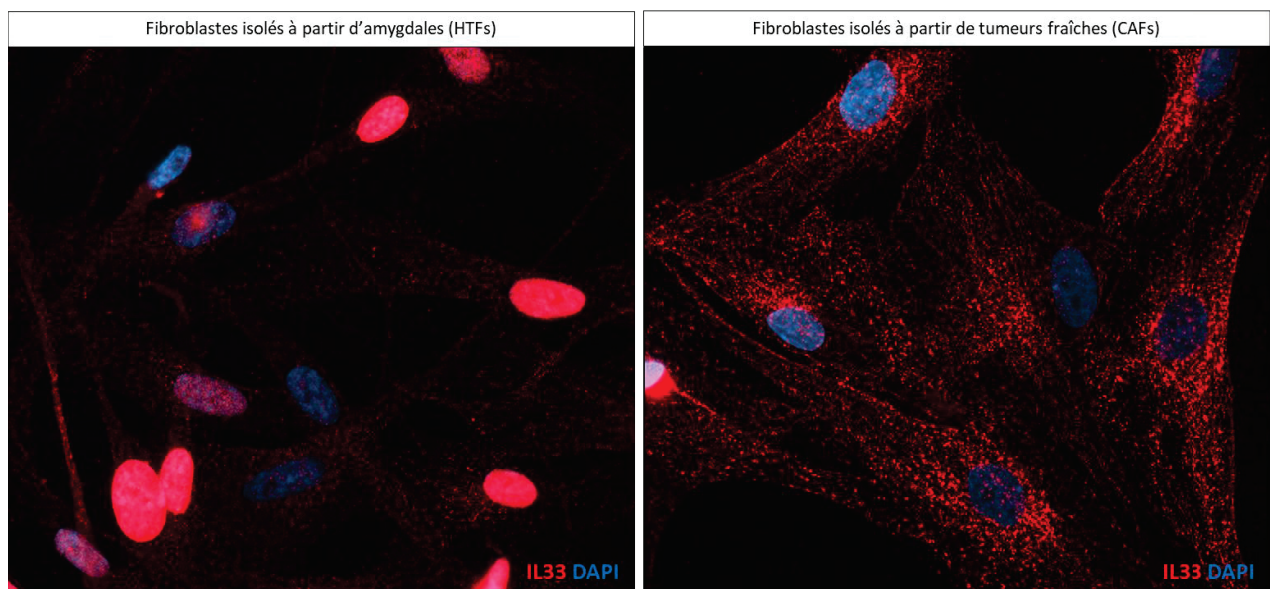


Figure complémentaire 12. Marquages de l'IL-33 obtenus par immunofluorescence dans des fibroblastes isolés d'amygdales ou isolés de tumeurs du sein

Les fibroblastes ont été isolés par technique d'adhérence sélective après dilacération mécanique de tissus humains issus de résections chirurgicales d'amygdales ou de tumeurs afin d'analyser l'expression d'IL-33 par immunofluorescence. HTFs: Human Tonsils Fibroblasts, CAFs: Cancer-Associated Fibroblasts.

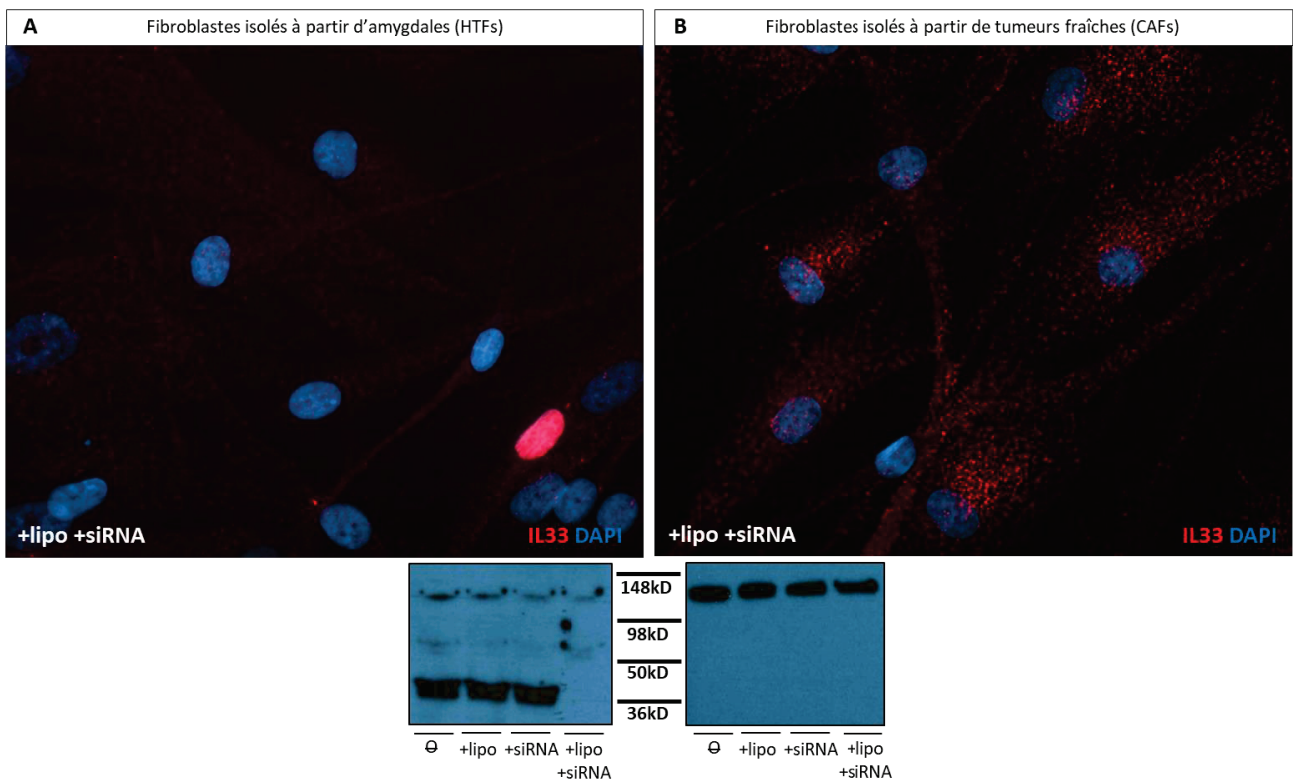


Figure complémentaire 13. Le marquage cytoplasmique d'IL-33 n'est pas spécifique de la forme mature de la protéine

Analyse par immunofluorescence et par Western Blot de l'expression d'IL-33 dans les HTFs (A) ou les CAFs (B) traités avec un ARN interférant (siRNA) dirigé spécifiquement contre l'IL-33. \emptyset : cellules non traitées, +lipo : cellules traitées avec de la lipofectamine seulement, +siRNA : cellules traitées avec le siRNA seulement, +lipo +siRNA : cellules traitées avec la lipofectamine et le siRNA.

III. L'IL-33 : actrice de l'immunosurveillance des tumeurs ?

1. L'IL-33 est associée à un bon pronostic dans le cancer du sein

Pour étayer notre hypothèse d'un rôle de l'IL-33 au cours de l'immunosurveillance, notre analyse de la base de données cliniques TCGA montre une association positive entre la survie des patients et l'expression de l'ARNm codant l'IL-33 dans les cancers du sein, du foie, du poumon et dans le mélanome (4/14 cancers analysés) ; et l'expression de ST2 dans les cancers du rein, du foie et le mélanome (3/14 cancers analysés). L'impact positif de l'IL-33 sur la survie des patientes dans le cancer du sein est indépendant d'autres facteurs cliniques pronostiques tels que le sous-type moléculaire et le stade de la tumeur, positionnant ainsi l'expression d'IL-33 comme un nouveau facteur pronostique indépendant dans le cancer du sein. En revanche, nous avons observé que l'IL-33 est associée à un impact négatif sur la survie de patients atteints de cancer de la vessie, et n'a pas d'impact dans 9 cancers (colon, tête et cou, rein, gliome, ovaire, pancréas, prostate, estomac et thyroïde). Par contraste, parmi les autres cytokines de la famille des IL-1s, l'IL-18 est associée à une augmentation de la survie dans le mélanome seulement (1/14) et à une survie diminuée dans le gliome et le cancer du pancréas (2/14) tandis que l'IL-1 α et l'IL-1 β sont exclusivement associées à une diminution de la survie des patients dans divers cancers (5/14 et 1/14 respectivement).

Ces résultats constituent ainsi une évidence forte d'un rôle anti-tumoral de l'IL-33 endogène et sont en accord avec les études associant l'IL-33 à un meilleur pronostic dans les carcinomes hépatiques, les cancers de la prostate, du rein ou des glandes salivaires (Brunner et al., 2015; Saranchova et al., 2016; Rössle et al., 2016). Par ailleurs, dans le cancer du sein spécifiquement, une étude récente a montré que l'IL-33 est également associée à une meilleure survie dans les cancers du sein métastatiques et cette observation clinique réalisée chez l'homme a été confirmée dans un modèle murin de cancer du sein où l'injection d'IL-33 exogène diminue la taille et le nombre de métastases pulmonaires (Qi et al., 2020a). Toutefois, ces observations sont en contradiction avec d'autres études qui rapportent un rôle délétère de l'IL-33 sur le pronostic vital des patients dans les cancers de la tête et du cou (Chen et al., 2013; Ishikawa et al., 2014; Wen et al., 2019), du côlon (Fang et al., 2017), du col de l'utérus (Wu and Zhang, 2016), du poumon (Hu et al., 2013), du rein (Wu et al., 2018), dans les cancers gastriques (Hu et al., 2017), le glioblastome (Gramatzki et al., 2016) ou encore le cancer du sein paradoxalement (Yang et al., 2015). Plus particulièrement, l'étude de Yang *et al.*, également réalisée dans le cancer du sein s'intéresse à l'expression sérique d'IL-33 qui peut avoir un rôle différent de l'IL-33 libérée au niveau local dans la tumeur dont l'expression est évaluée dans les données issues du TCGA.

En complément de ces analyses, nous évaluons actuellement l'impact clinique de l'expression d'IL-33 par immunohistochimie à partir d'un TMA réalisé sur une cohorte de 199 patientes atteintes de cancers du sein (collaboration avec le Dr Philippe Krebs, Université de Berne). L'évaluation de l'expression de ST2 et de NKp46 sur des coupes sériées issues de ce même TMA nous permettra d'estimer la corrélation entre l'IL-33, ST2 et la présence de cellules NK.

En perspectives, l'utilisation de modèles murins tels que les souris déficientes pour l'expression d'IL-33 (obtenues grâce à une collaboration avec Jean-Philippe Girard, IPBS, Toulouse) ou encore des modèles de tumorigénèse spontanée devrait permettre d'étudier l'impact de la croissance tumorale sur la libération d'IL-33 et en retour le rôle endogène de cette dernière sur la croissance tumorale dès les stades précoces. Chez l'homme, le développement de nouveaux outils permettra certainement de répondre aux questions concernant la libération d'IL-33 auxquelles malheureusement nous n'avons pas pu répondre à ce jour, malgré leur grand intérêt.

2. Polarisation de l'IL-33 vers une activité immunitaire de type-1 anti-tumorale

La dépendance vis-à-vis des cytokines que nous avons observée pour induire une réponse des cellules NK à l'IL-33 indique que le contexte physiopathologique et cytokinique est un élément clé dans la régulation de l'activité de l'IL-33. Cette particularité est observée de manière plus générale sur l'ensemble des cellules de l'immunité de type-1 (Yang et al., 2011; Baumann et al., 2015), et souligne une distinction par rapport à son activité plutôt constitutive sur les cellules de l'immunité de type-2. Une question centrale quant à l'étude d'une cytokine aussi pléiotrope que l'IL-33 est donc l'identification des paramètres biologiques qui orientent son activité vers un type de réponse au détriment d'une autre, dans notre contexte vers une réponse anti-tumorale au détriment de son rôle pro-tumoral. A ce jour, l'IL-33 a été associée à une réponse immunitaire de type-1 en présence d'une infection virale (Yang et al., 2011; Bonilla et al., 2012; Baumann et al., 2015) et dans quelques études en contexte tumoral (Gao et al., 2013, 2015; Jin et al., 2018; Qi et al., 2020b). Dans ces contextes, elle induit la production d'IFN- γ par les cellules NK ou les LT, bien que les mécanismes l'orientant dans

cette voie sont rarement identifiés. Une étude récente a démontré que le TNF- α produit par les macrophages en contexte tumoral induit l'expression de ST2 sur les cellules NK qui présentent ainsi une activité anti-tumorale en réponse à l'IL-33 (Qi et al., 2020b). Nous proposons donc que des cytokines telles que l'IL-12 et l'IL-2, impliquées dans les réponses de type-1, ou encore l'IL-15 qui joue un rôle crucial dans la biologie des cellules NK, sont nécessaires pour orienter l'activité de l'IL-33 vers une immunité de type-1 importante au cours de la phase d'immunosurveillance.

3. Source d'IL-12 en contexte tumoral

La sécrétion d'IL-12 par les DCs et les macrophages est un des principaux mécanismes contrôlant les infections suite à la détection d'antigènes exogènes au niveau des ganglions et des tissus (Mashayekhi et al., 2011; Martínez-López et al., 2015; Torres et al., 2016; Everts et al., 2016). Des observations similaires ont été réalisées en contexte tumoral (Broz et al., 2014; Zitvogel and Kroemer, 2014; Böttcher et al., 2018). Nous proposons donc que les DCs et les macrophages activés suite à la détection d'antigènes tumoraux constituent une source importante d'IL-12 à proximité des cellules immunitaires impliquées dans la réponse de type-1, dont les cellules NK (Muller-Berghaus et al., 2005; Nizzoli et al., 2013; Hsieh et al., 1993). En accord avec ce modèle, une étude récente suggère que l'IL-12 dérivée de DC de type cDC1 est essentielle pour l'activité anti-tumorale des cellules NK (Mittal et al., 2017). En retour, l'IFN- γ produit par ces dernières soutient la production d'IL-12 par les cDC1 (Alexandre et al., 2016). Ainsi, la libération d'IL-12 à proximité des cellules productrices d'IL-33 pourrait permettre une coopération de ces deux cytokines pour activer les fonctions anti-tumorales des cellules NK. Un tel phénomène a été décrit dans un modèle murin de COPD où la présence d'une infection virale provoque la libération concomitante d'IL-12 par les cellules immunitaires et d'IL-33 par les cellules épithéliales endommagées, induisant ainsi une puissante réponse inflammatoire de type-1 médiée en partie par les cellules NK (Kearley et al., 2015). L'exposition des cellules NK à l'IL-12 peut ainsi avoir lieu tant en périphérie dans les ganglions ou au niveau local lorsque les tumeurs sont infiltrées.

En lien avec cette hypothèse, nous avons quantifié la présence d'IL-12 dans les surnageants de dilacération des tumeurs mammaires issues de résections chirurgicales. Bien que nous observons des quantités non négligeables d'IL-12p40, l'IL-12p70 bioactive semble absente (**Figure complémentaire 14**). Ceci peut être dû à une limite de détection par la technique utilisée (dosages par technologie MSD) mais pourrait également correspondre à une réalité biologique. En effet, on peut envisager que l'expression d'IL-12p70 est graduellement perdue au cours de la tumorigenèse suite à la diminution de l'activation des DCs et des macrophages qui évoluent progressivement vers un profil dysfonctionnel voire immunosuppresseur. L'IL-12 bioactive serait donc absente des tumeurs auxquelles nous avons accès qui correspondent généralement à des stades avancés, où la tumeur progresse et a donc probablement échappé à la surveillance immunitaire. Ainsi, la diminution d'IL-12 associée au développement d'un microenvironnement immunosuppresseur pourrait être responsable de l'orientation de l'activité de l'IL-33 en faveur de l'activation des cellules immunitaires de type-2 (Cheon et al., 2011; Jovanovic et al., 2014; Li et al., 2014; Maywald et al., 2015; Zhang et al., 2017b; Andersson et al., 2018; Eissmann et al., 2019) ou des Tregs (Pastille et al., 2019; Li et al., 2019; Ameri et al., 2019; Jevtovic et al., 2020) et constituer ainsi un mécanisme d'immuno-échappement au même titre que la perte d'expression d'IL-33 elle-même. En accord avec cette hypothèse, un défaut de production d'IL-12 a été observé au cours de la tumorigenèse chez des patientes atteintes de cancer du sein et la

diminution du ratio IL-33/IL-12 a été associée à un déséquilibre vers une réponse de type 2 au détriment d'une réponse de type-1, favorisant ainsi la croissance tumorale (Jafarzadeh et al., 2015). Ceci pourrait expliquer les effets pro-tumoraux de l'IL-33 observés dans de nombreux modèles pré-cliniques (Jovanovic et al., 2014; Yamada et al., 2015; Xiao et al., 2016) mais également chez les patients dans les cancers de la tête et du cou (Chen et al., 2013; Ishikawa et al., 2014; Wen et al., 2019), du sein (Yang et al., 2015), du côlon (Fang et al., 2017) et du col de l'utérus (Wu and Zhang, 2016).

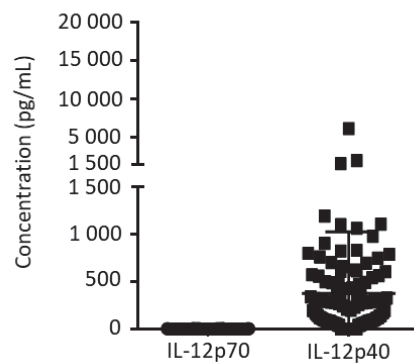


Figure complémentaire 14. L'IL-12 (IL-12p40), contrairement à l'IL-12p70, est présente dans les surnageants issus de la dilacération de tumeurs du sein

Analyse de la concentration d'IL-12p70 et d'IL-12-p40 dans les surnageants issus de la dilacération de tumeurs du sein (n=112 patientes).

Partie 3 : Les cellules NK ST2⁺ : nouvelle cible thérapeutique pour le traitement des cancers ?

I. Identification de cellules NK ST2⁺ dans le cancer du sein

En accord avec les observations de Mamessier *et al.* (Mamessier et al., 2011), nous avons observé la présence de cellules NK dans des suspensions cellulaires issues de tumeurs primaires de patientes atteintes de cancers du sein. Par ailleurs, nos résultats préliminaires montrent qu'une sous-population (environ 2 à 15%) de cellules NK infiltrant les tumeurs du sein exprime ST2 à l'état basal immédiatement après obtention de la suspension cellulaire issue de la dilacération mécanique et de la digestion enzymatique de la tumeur, contrairement aux cellules NK circulantes (**Figure complémentaire 15**). Ces résultats montrent que les cellules NK ont été exposées à l'IL-12 dans le microenvironnement tumoral. En revanche ST2 n'est pas exprimé à la surface des LT infiltrant ces tumeurs. En perspectives de cet axe, nous analysons actuellement les résultats d'une étude de sc-RNA-seq (Azizi et al., 2018) réalisée sur environ 50 000 cellules immunitaires (CD45⁺) isolées de tumeurs du sein et incluant environ 2000 cellules NK afin d'identifier si une sous-population de cellules NK exprime ST2 en contexte tumoral. Toutefois, plusieurs paramètres risquent de limiter leur identification : i) seulement 2 à 15% de cellules NK intratumorales expriment ST2, représentant ainsi environ 100 cellules NK séquencées et ii) la méthode de séquençage utilisée dans cette étude (technologie InDrop) a permis de séquencer moins de 1000 gènes par cellule NK, ce qui compromet l'identification de

l'ARNm de *ST2* faiblement exprimé dans les cellules NK. En complément de cet axe, nous espérons identifier des cellules NK exprimant *ST2 in situ* grâce à notre analyse en cours de l'expression de *ST2* et *NKp46* par IHC sur TMA de tumeurs du sein (en collaboration avec l'anatomopathologiste Tilman Roos et Philippe Krebs à l'université de Berne).

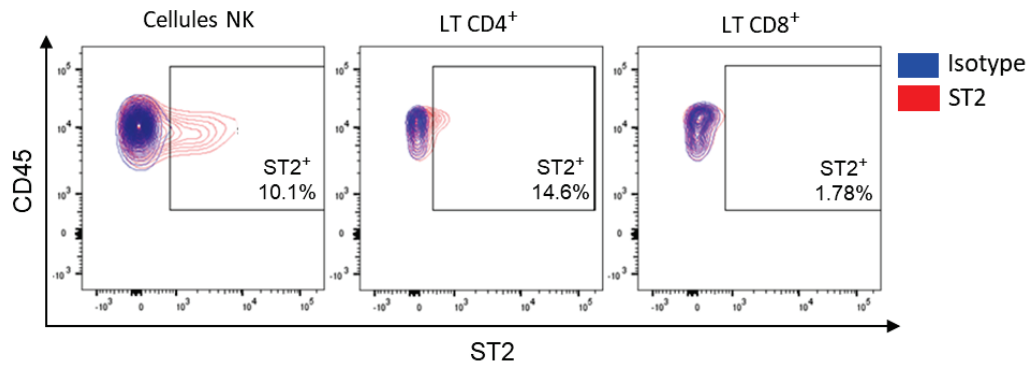


Figure complémentaire 15. Mise en évidence de l'expression de *ST2* à la surface d'une sous-population de cellules NK intra-tumorales

Analyse de l'expression de *ST2* à la surface des cellules NK, des LT CD4⁺ et CD8⁺ infiltrant les tumeurs du sein humaines par cytométrie en flux.

II. Réponse des cellules NK intra-tumorales à l'IL-33 *ex vivo*

Nous nous sommes intéressés à la capacité des cellules NK périphériques et intra-tumorales isolées de patientes atteintes de cancers du sein de répondre à une stimulation *ex-vivo* par l'IL-33 seule ou combinée à l'IL-12, matérialisée par l'activation de la voie NF-κB (phosphorylation de p65) et la production d'IFN-γ. Malgré l'expression de *ST2* sur une fraction de cellules NK intratumorales à l'état basal (Figure complémentaire 15), elles ne répondent pas à l'IL-33 seule comme le montre l'absence de phosphorylation de p65. En revanche, une partie des cellules NK périphériques mais également intra-tumorales isolées des patientes répond à la combinaison d'IL-33 avec l'IL-12, comme le montrent la phosphorylation de p65 et la sécrétion d'IFN-γ. Cette différence peut s'expliquer, comme montré précédemment (Figure complémentaire 2), par la stricte dépendance vis-à-vis de l'IL-12 pour maintenir la production d'IFN-γ par les cellules NK en réponse à l'IL-33, qui est ainsi perdue lorsque les cellules NK intratumorales sont activées *ex vivo* pendant 24hrs hors de leur microenvironnement cytokinique.

De manière intéressante, l'intensité de la réponse dans les cellules NK intratumorales et circulantes des patientes est comparable à celle observée dans les cellules NK périphériques isolées chez des donneurs sains. Cette observation s'oppose au défaut fonctionnel rapporté pour les cellules NK intratumorales (Mamessier et al., 2011) et périphériques (Verronèse et al., 2016) dans le cancer du sein. Elle peut s'expliquer par l'utilisation de signaux différents pour activer les cellules NK. Ainsi, les cellules NK conserveraient leur réponse à l'IL-33 alors qu'elles répondraient moins bien à l'IFN-α (Verronèse et al., 2016) ou à la cible K562 (Mamessier et al., 2011). Dans les mêmes conditions, nous

n'avons pas observé de phosphorylation de p65 dans les LT (cellules CD3⁺) présents dans la tumeur à l'IL-33, montrant qu'ils sont insensibles à l'IL-33. Ceci peut s'expliquer par un niveau faible d'expression de ST2 observé sur les lymphocytes T intratumoraux (**Figure complémentaire 15**). Par ailleurs, ces LT intra-tumoraux regroupent entre autre les Tregs (CD3⁺ FoxP3⁺) qui infiltrent abondamment les tumeurs du sein (20 à 40% des LT CD4⁺). Ainsi, ces résultats ne semblent pas être en faveur d'un enrichissement et d'une activation des Tregs ST2⁺ en contexte tumoral, contrairement à ce qui a pu être décrit dans des modèles murins de cancer du sein (Jovanovic et al., 2014), du poumon (Li et al., 2019) et de la peau (Ameri et al., 2019) ou chez l'homme dans le cancer du sein (Plitas et al., 2016) ou du côlon (Pastille et al., 2019). Ces discordances peuvent s'expliquer par des particularités biologiques quant au rôle des Tregs ST2⁺ propres à chaque type de cancer. Pour les données obtenues dans le cancer du sein, l'utilisation de technologies différentes pour évaluer l'expression de ST2 (RNA-seq pour l'étude de Plitas *et al.* versus cytométrie en flux pour notre étude) pourrait expliquer ces différences.

Dans l'ensemble, nos résultats sont en faveur de l'efficacité de la combinaison d'IL-33 avec l'IL-12 pour revigorer les cellules NK périphériques et intra-tumorales isolées de patientes atteintes de cancers, qui présentent généralement une réponse réduite à certaines activations classiques (Dahlberg et al., 2015; Verronèse et al., 2016). A ce jour, de nombreux protocoles d'amplification et de stimulation des cellules NK *ex vivo* avant transfert adoptif utilisent des cytokines telles que l'IL-15, l'IL-12, l'IL-18 ou encore l'IL-21 afin d'exploiter la capacité de ces cytokines à induire la prolifération, l'activation ou encore un phénotype mémoire des cellules NK (Granzin et al., 2017). Ainsi, nos résultats justifient la nécessité d'évaluer le bénéfice de l'utilisation de l'IL-33 en combinaison avec les stratégies utilisées à ce jour dans les protocoles d'expansion et d'activation *ex vivo* des cellules NK allogéniques mais également autologues avant transfert adoptif (cytokines, cellules « nourricières »).

III. Effet anti-tumoral de l'IL-33 combinée à l'IL-12 *in vivo* dans un modèle murin de cancer du sein

De par sa capacité à ré-activer *ex vivo* les cellules NK isolées de patientes atteintes de cancer du sein, nous avons émis l'hypothèse que l'IL-33, lorsque qu'elle est combinée à l'IL-12, pourrait exercer un effet thérapeutique sur le développement des tumeurs primaires *in vivo*.

Ainsi, nous avons tiré profit du modèle tumoral mammaire E0771, dont le développement *in vivo* est peu agressif et inflammatoire, et pour lequel nous avons validé le rôle prépondérant des cellules NK dans le contrôle de la croissance tumorale. Nous avons choisi d'implanter les cellules tumorales par voie orthotopique, directement dans la glande mammaire des souris, de manière à obtenir un modèle plus proche de la physiopathologie, avec des tumeurs « primaires » qui se développent au sein du microenvironnement mammaire et, qui, ainsi se rapprochent davantage des tumeurs de patientes. L'injection d'IL-33 combinée à l'IL-12 *in vivo* dans ce modèle inhibe la croissance tumorale et améliore la survie des souris par rapport aux souris non traitées ou traitées avec l'IL-33 seule ou l'IL-12 seule. De manière intéressante, cet effet est dépendant des cellules NK et indépendant des LT (expériences de déplétion avec un anticorps anti-NK1.1 dans des souris immunocompétentes et dans des souris *Rag2-KO* dépourvues de LT). Des études précédentes ont déjà montré un effet anti-tumoral de l'injection d'IL-12 seule, notamment via l'activation des cellules NK (Takeda et al., 2000; Smyth et al., 2001) et de l'IL-33 seule via l'activation de cellules immunitaires anti-tumorales telles que les LT CD4⁺ ou CD8⁺ et

les éosinophiles (Villarreal et al., 2014; Qin et al., 2016; Lucarini et al., 2017). De plus, dans des modèles de cancer du poumon (Gao et al., 2013, 2015) ou d'hépatocarcinome (Jin et al., 2018), l'expression artificielle d'IL-33 par transfection dans des lignées cellulaires tumorales permet le recrutement des LT CD4⁺, CD8⁺ (Gao et al., 2015; Jin et al., 2018) et des cellules NK (Gao et al., 2015) dans la tumeur mais également en périphérie, réduisant ainsi la croissance tumorale et la formation de métastases via l'activation des fonctions cytotoxiques et de la production d'IFN- γ . A ma connaissance, notre travail démontre pour la première fois l'effet anti-tumoral de la combinaison d'IL-33 et d'IL-12 *in vivo*.

Par ailleurs, nous avons observé la production d'IFN- γ dans le sérum, uniquement en réponse à la combinaison d'IL-33 et d'IL-12. Tout d'abord, nous chercherons à démontrer que l'IFN- γ produit est impliqué dans l'effet anti-tumoral de la combinaison d'IL-33 et d'IL-12. Nous sommes actuellement en train de reproduire les mêmes expériences que précédemment en associant le traitement par l'IL-33 et l'IL-12 avec la neutralisation *in vivo* de l'IFN- γ (utilisation d'anticorps anti-IFN- γ neutralisants) afin de confirmer que la diminution de la croissance tumorale dans ce modèle est dépendante de la production d'IFN- γ . De plus, nous avons démontré que la production d'IFN- γ dans le sérum est elle aussi dépendante des cellules NK. Nous souhaitons déterminer l'origine de cet IFN- γ , à savoir s'il est le résultat d'une production locale dans la tumeur par les cellules NK intratumorales et/ou systémique par les cellules NK circulantes. Pour cela, nous effectuerons des marquages de l'IFN- γ intracytoplasmique par cytométrie en flux sur les cellules NK circulantes et infiltrant les tumeurs, en comparaison avec les LT et les cellules NKT, afin de démontrer que les principaux producteurs d'IFN- γ dans notre modèle sont effectivement les cellules NK.

Outre les cellules NK, l'anticorps anti-NK1.1 induit également la déplétion des cellules NKT et ne nous permet donc pas d'exclure un rôle de ces cellules dans notre modèle. Par ailleurs, il a été observé que l'IL-33 active également les cellules NKT (Smithgall et al., 2008; Bourgeois et al., 2009). L'anticorps ciblant la protéine asialo-GM1, également utilisé pour éliminer les cellules NK *in vivo*, induit quant à lui la déplétion d'une partie des LT CD8⁺. Nous n'avons donc pas privilégié l'utilisation de cet anticorps dans notre modèle. Toutefois, nous pourrions utiliser cet anticorps pour dépléter les cellules NK sans dépléter les cellules NKT et donc conclure sur le rôle des cellules NKT dans notre modèle. Par ailleurs, nous pourrions confirmer le rôle prépondérant des cellules NK dans l'effet anti-tumoral de la combinaison d'IL-33 avec l'IL-12 en implantant la lignée tumorale E0771 chez des souris transgéniques *Ncr1*(NKp46)-DTR dans lesquelles l'injection de toxine diphtérique (DT) provoque l'élimination sélective des cellules NK sans affecter les cellules NKT qui n'expriment pas NKp46. Par la suite, le croisement de souris exprimant la recombinase CRE sous le contrôle du promoteur du gène *Ncr1* codant NKp46 (*Ncr1*-CRE), exprimé spécifiquement dans les cellules NK, avec des souris porteuses de sites de recombinaison de type « lox » de part et d'autre du gène *St2* (*St2*^{fl/fl}) (collaboration G Trinchieri, USA) nous permettra d'induire la perte d'expression de ST2 spécifiquement dans les cellules NK afin de valider l'importance de l'axe IL-33/ST2 dans la réponse immunitaire anti-tumorale médiée par ces dernières.

Concernant notre approche expérimentale *in vivo*, nous avons choisi une voie d'injection péri-tumorale des cytokines, qui mime les effets de la libération d'IL-33 dans le microenvironnement tumoral. Il serait ainsi intéressant d'évaluer si la combinaison d'IL-33 et d'IL-12 délivrée de manière systémique conserve son effet anti-tumoral sur la tumeur primaire. Par ailleurs, nous avons choisi de commencer à administrer les cytokines deux jours après l'implantation des cellules tumorales. Notre

objectif était de valider *in vivo* un effet anti-tumoral de la combinaison d'IL-33 et d'IL-12, via les cellules NK, comme le supposaient nos données *in vitro* chez l'homme. Bien que ce protocole ne reflète pas forcément le contexte clinique où la tumorigénèse est généralement avancée au moment de l'intervention thérapeutique, ce choix expérimental a été guidé par le fait que les cellules NK inhibent le développement tumoral dans les 6 premiers jours après implantation des cellules E0771 (**Figure complémentaire 16**).

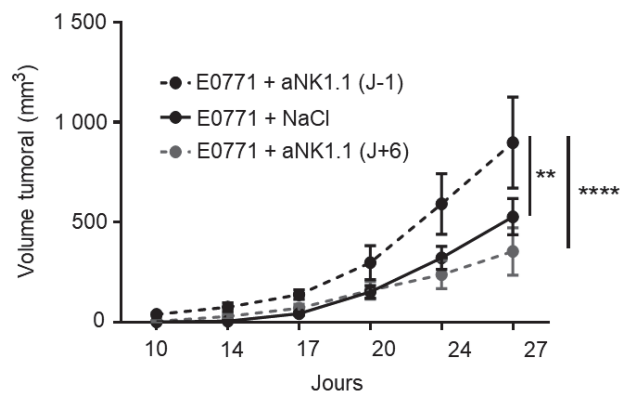


Figure complémentaire 16. Contrôle précoce de la croissance tumorale par les cellules NK dans le modèle E0771

Suivi de la croissance tumorale des cellules E0771 injectées par voie intramammaire (2.5×10^5 cellules) chez des souris sauvages déplétées (+aNK1.1) ou non (+NaCl) en cellules NK 1 jour avant (J-1) ou 6 jours après (J+6) l'injection des cellules tumorales.

Plus récemment, dans le modèle 4T1 de tumeur mammaire agressive et hautement métastatique, il a été observé que l'IL-33 a un effet bénéfique sur le contrôle des métastases, via le recrutement et l'activation des cellules NK via les éosinophiles (Qi et al., 2020a). Nos résultats viennent ainsi compléter ces observations en apportant la démonstration d'un effet anti-tumoral de l'IL-33 sur la tumeur primaire, lorsque celle-ci est combinée à l'IL-12. Il serait également intéressant de tester si cette combinaison a un effet sur le développement de métastases spontanées dans les poumons ou dans les os de souris porteuses de tumeurs E0771 ; d'autant que nous avons observé la production systémique d'IFN- γ . Toutefois, le pouvoir métastatique de ce modèle étant relativement faible, ceci nécessitera sans doute le retrait chirurgical de la tumeur primaire lorsque celle-ci atteint la taille limite tolérée par les bonnes pratiques éthiques en expérimentation animale, afin de laisser les métastases se développer suffisamment pour pouvoir les quantifier et étudier leur évolution.

Ces résultats sont contradictoires avec d'autres études démontrant un rôle pro-tumoral de l'IL-33 dans des modèles murins de cancer du sein. Néanmoins, de nombreuses différences dans le choix des modèles, de la source d'IL-33, du mode d'injection des cellules tumorales mais également de l'IL-33 (injection systémique ou locale) ou encore le schéma thérapeutique (fréquence et dose du traitement) choisis sont tant de paramètres qui peuvent expliquer ces observations discordantes. Tout d'abord, en l'absence d'IL-12 ou d'un co-signal tel qu'un vaccin de type d'ADN viral (Villarreal et al., 2014), on peut imaginer que l'IL-33 active préférentiellement les cellules de l'immunité de type-2 qui expriment ST2 très fortement et de manière constitutive, qu'elle soit endogène ou délivrée en tant qu'agent thérapeutique (Jovanovic et al., 2014; Yamada et al., 2015). Par ailleurs, certains modèles très

agressifs, représentatifs de tumeurs avancées et souvent hautement métastatiques, tels que le modèle 4T1 pour le cancer du sein (Jovanovic et al., 2014; Xiao et al., 2016) ou le modèle B16 pour le mélanome ne sont pas adaptés à l'étude des phénomènes d'immunosurveillance qui régulent la croissance tumorale aux stades précoces. En outre, un rôle anti-tumoral de l'IL-33 via l'activation des cellules NK et des LT CD8⁺ a été mis en évidence dans le modèle B16 modifié pour induire l'expression d'IL-33 par les cellules tumorales, suggérant que la restauration de l'expression d'IL-33 dans ces tumeurs agressives et avancées pourrait permettre de ré-activer une réponse immunitaire anti-tumorale efficace (Gao et al., 2013).

De manière intéressante, malgré une croissance tumorale retardée chez les souris traitées par la combinaison d'IL-12 et d'IL-33, à terme, toutes les souris développent des tumeurs de taille importante. Par ailleurs, l'arrêt du traitement induit une recrudescence de la croissance tumorale, et ce, même après plusieurs injections de cytokines (**Figure complémentaire 17**). Ces observations suggèrent que la réponse immunitaire induite par la combinaison d'IL-33 et d'IL-12, bien qu'efficace pour ralentir la croissance tumorale, ne suffit pas à éliminer les cellules tumorales de manière durable et suffisante. Ainsi, il serait intéressant de combiner l'administration des cytokines avec des thérapies ciblant le système immunitaire telles que les inhibiteurs d'ICP (anti-PD-1 et anti-CTLA-4) afin d'évaluer le bénéfice de l'activation des cellules NK par l'IL-33 en parallèle de la levée de mécanismes immunosuppresseurs. Récemment, il a été rapporté que l'utilisation d'IL-33 en combinaison avec des anticorps anti-PD-1 potentialise la réponse anti-tumorale dans un modèle de cancer du pancréas en activant les ILC2 (Moral et al., 2020). Toutefois, l'absence d'IL-12 dans ce schéma thérapeutique ne permet probablement pas d'activer les cellules NK dans ce modèle.

Enfin, il serait intéressant d'évaluer si l'effet thérapeutique obtenu par la combinaison d'IL-12 et d'IL-33 est conservé dans i) d'autres modèles de tumeurs primaires du sein, transplantés (par ordre décroissant d'agressivité: 4T1, MCF-7, MDA-MB231, EMT6) ou spontanés (MMTV-PyMT), et ii) d'autres types de carcinomes tels que les cancers de la langue induits par application de carcinogène spontané et reproduisant différents stades de la tumorigénèse (4NQO) (Schoop et al., 2009), de mélanome induit par injection orthotopique sous-cutanée (B16) et bien d'autres modèles murins de carcinomes classiquement utilisés et disponibles au CRCL, afin d'évaluer son universalité.

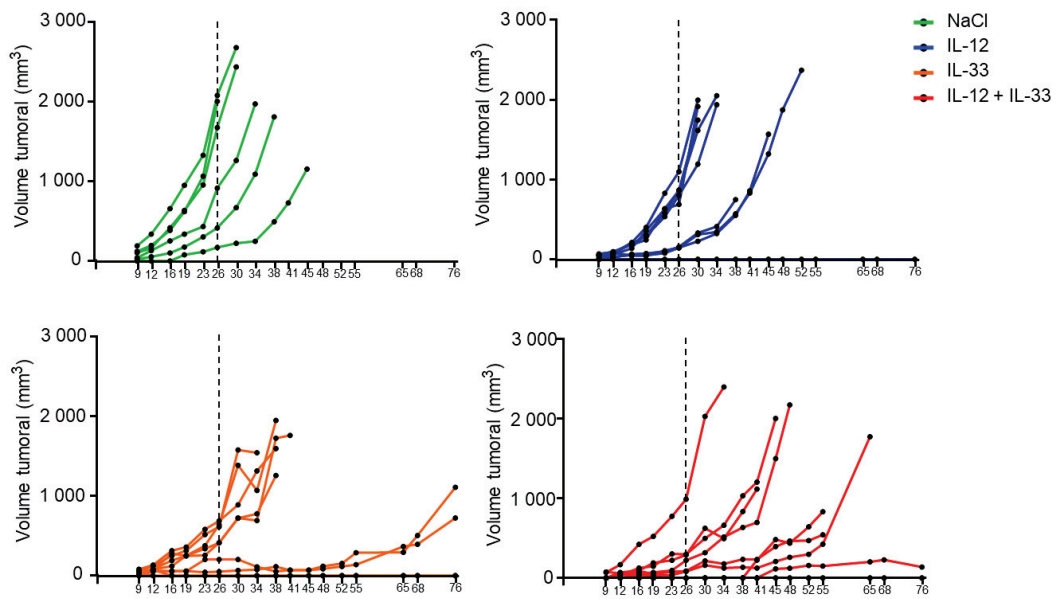


Figure complémentaire 17. La croissance tumorale du modèle E0771 augmente après arrêt de l'administration des cytokines

Suivi de la croissance tumorale des cellules E0771 injectées par voie intramammaire (2.5×10^5 cellules) chez des souris sauvages traitées aux temps indiqués par voie peri-tumorale avec du NaCl, de l'IL-12 seule (10ng/souris), de l'IL-33 seule (100ng/souris) ou avec la combinaison d'IL-12 et d'IL-33. Le trait en pointillé symbolise l'arrêt du traitement.

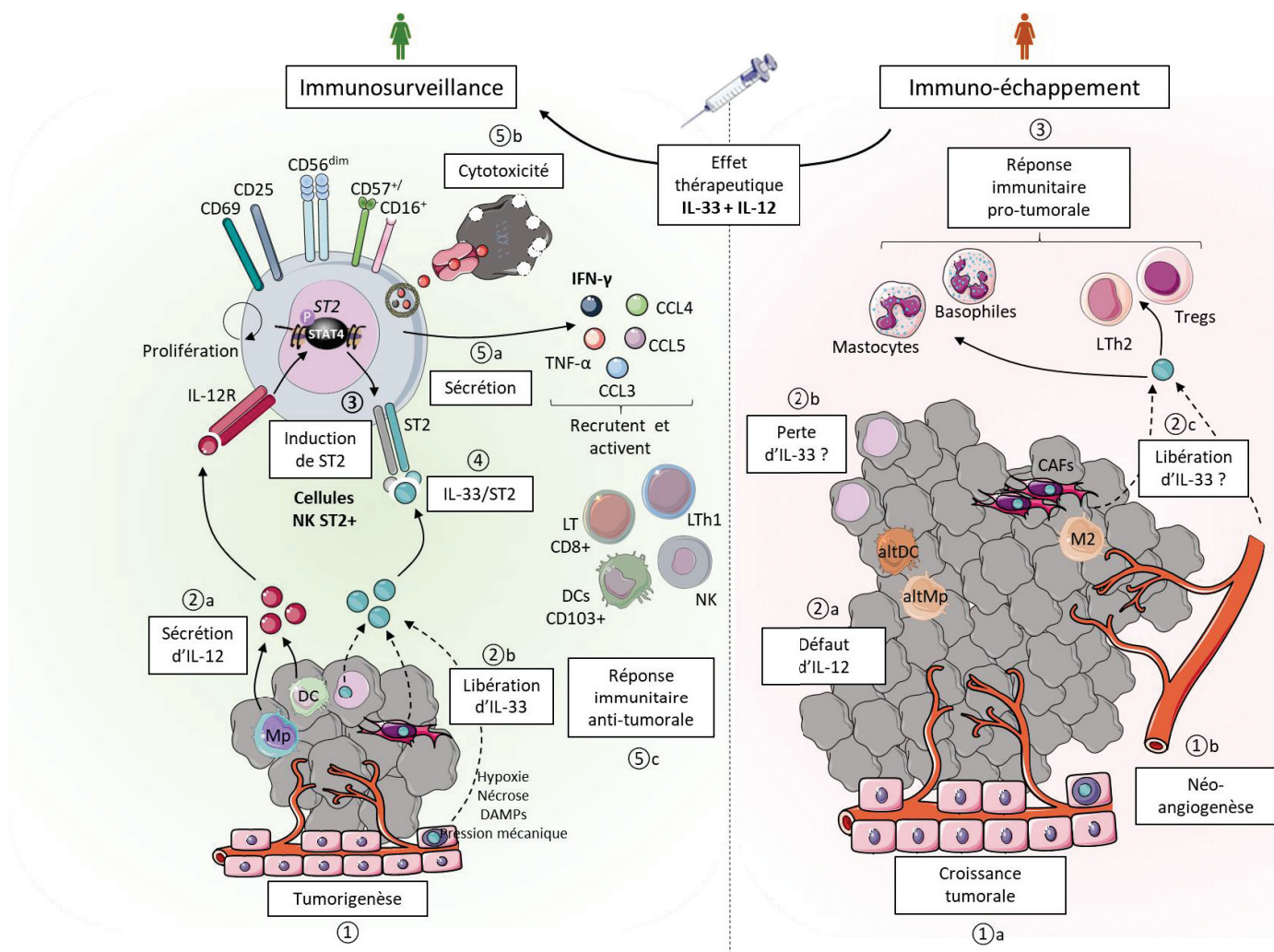


Figure 24. Modèle du rôle de l'IL-33 dans la régulation de la réponse immunitaire en contexte tumoral

D'après nos résultats ainsi que les données de la littérature, l'IL-33 semble jouer un rôle duel sur la régulation de la réponse immunitaire en contexte tumoral. Nous proposons que dans les phases précoces de la tumorigénèse, l'IL-33 peut être libérée par les cellules qui l'expriment (cellules endothéliales, épithéliales, stromales) et agir comme un signal de danger pour activer les cellules immunitaires. En présence d'IL-12, libérée par les cellules dendritiques (DC) et les macrophages (Mp) activés, les cellules NK peuvent acquérir l'expression de ST2 et devenir sensibles à l'IL-33 libérée dans le microenvironnement. L'activation de la voie IL-33/ST2 dans les cellules NK induirait leur prolifération ainsi que leurs fonctions cytotoxiques envers les cellules tumorales et sécrétrices permettant le recrutement et l'activation de cellules immunitaires impliquées dans la réponse anti-tumorale (LT CD8⁺, cellules NK, LTh1, DCs). A ce stade, l'IL-33 jouerait un rôle anti-tumoral et serait associée à un bon pronostic. Toutefois, l'interaction entre la tumeur et son microenvironnement favorise la mise en place de mécanismes d'échappement à la réponse immunitaire. Ainsi, dans notre modèle, la diminution de la production d'IL-12 suite à une altération des DCs et des macrophages (altDC, altMp) ne permettrait plus de maintenir l'expression de ST2 sur les cellules NK, perdant ainsi leur sensibilité à l'IL-33. Dans ce contexte, la perte de l'expression d'IL-33 dans les cellules tumorales agit comme un mécanisme d'échappement à l'activation des cellules immunitaires anti-tumorales. A ce stade, la libération d'IL-33 pourrait être assurée par les cellules stromales (cellules endothéliales, CAFs, macrophages M2) et l'IL-33 agirait préférentiellement sur les cellules qui expriment ST2 de manière constitutive, dont certaines sont impliquées dans la progression tumorale et l'immunosuppression (Tregs, mastocytes, LTh2, basophiles, éosinophiles). Dans ce contexte, l'IL-33 serait associée à un mauvais pronostic.

Conclusion

En conclusion, ce travail nous a permis de répondre à un ensemble de questions concernant la biologie des cellules NK en réponse à l'IL-33 *in vitro*, *ex vivo* chez l'homme mais également *in vivo* chez la souris dans le contexte du cancer du sein. Nous émettons l'hypothèse que l'IL-33 libérée dans le microenvironnement tumoral dès les stades précoces peut jouer un rôle dans l'immunosurveillance des cancers du sein, en coopérant avec l'IL-12 sécrétée par les cellules de l'immunité innée pour activer les cellules NK (Figure 24). En retour, ces dernières peuvent directement lyser les cellules tumorales ainsi que recruter et activer d'autres cellules immunitaires impliquées dans l'immunosurveillance via leur fonction sécrétrice. Toutefois, au cours de la tumorigenèse, l'établissement d'un microenvironnement suppresseur peut induire une diminution de la sécrétion d'IL-12 et ainsi compromettre l'activation des cellules NK en réponse à l'IL-33. Au cours de cette phase d'immuno-échappement, l'IL-33 activerait donc préférentiellement les cellules de type-2 ou encore les Tregs qui infiltrent les tumeurs et expriment ST2 de manière constitutive. A ce stade, l'IL-33 favoriserait donc la croissance tumorale.

Comme présenté dans cette discussion, ce travail offre à ce jour de nombreuses ouvertures. Ainsi, il me semble important de souligner les perspectives que nous avons privilégiées et qui sont actuellement en cours d'évaluation. Dans notre modèle murin, la démonstration formelle du rôle de la production d'IFN- γ par les cellules NK dans la réponse anti-tumorale induite par la combinaison d'IL-33 et d'IL-12 est aujourd'hui une priorité. Ainsi, nous sommes en train de réaliser des expériences de neutralisation de l'IFN- γ *in vivo* dans les souris sauvages en contexte d'injection d'IL-33 et d'IL-12 combinées. En parallèle, nous souhaitons valider ces observations dans un second modèle tumoral mammaire en évaluant le potentiel thérapeutique de l'IL-33 et de l'IL-12 dans le modèle de tumeur mammaire primaire EMT6 implanté de manière orthotopique chez des souris BALB/c. Par ailleurs, nous continuons d'accumuler des données pour analyser la réponse à l'IL-33 des cellules NK intra-tumorales et périphériques issues de patientes atteintes de cancers du sein dès que nous avons accès à des prélèvements dont la taille et l'infiltrat immunitaire sont suffisants pour permettre ces analyses. Enfin, l'évaluation de l'expression de l'IL-33, de ST2 et de NKp46 dans une cohorte de patientes atteintes de cancers du sein est en cours et nous permettra d'évaluer l'impact clinique de ces trois marqueurs sur la survie des patientes et de corrélérer leur expression avec les paramètres cliniques.

Clôture

Nos travaux auront, je l'espère, apporté de nouvelles connaissances sur des aspects fondamentaux tels que la biologie des cellules NK et leur diversité, mais également des aspects en lien avec l'investigation pré-clinique dans un modèle de tumeur mammaire primaire chez la souris et clinique par l'étude rétrospective de l'axe IL-33/ST2/NK à partir d'échantillons de patientes atteintes de cancer du sein. Nos données sont en faveur de la poursuite du développement pré-clinique des pistes thérapeutiques que nous avons initiées *in vivo*, mais également de l'implémentation de l'IL-33 dans l'arsenal de molécules utilisées *in vitro* pour étudier la biologie des cellules NK ou à des fins thérapeutiques pour stimuler ou re-stimuler ces dernières dans des protocoles de transferts adoptifs chez les patients.

Bibliographie

- Abdul-Careem, M.F., Lee, A.J., Pek, E.A., Gill, N., Gillgrass, A.E., Chew, M.V., Reid, S., and Ashkar, A.A. (2012). Genital HSV-2 infection induces short-term NK cell memory. *PLoS ONE* 7, e32821.
- Abston, E.D., Barin, J.G., Cihakova, D., Bucek, A., Coronado, M.J., Brandt, J.E., Bedja, D., Kim, J.B., Georgakopoulos, D., Gabrielson, K.L., et al. (2012). IL-33 independently induces eosinophilic pericarditis and cardiac dilation: ST2 improves cardiac function. *Circ Heart Fail* 5, 366–375.
- Ahmad, A., Hanby, A., Dublin, E., Poulson, R., Smith, P., Barnes, D., Rubens, R., Anglard, P., and Hart, I. (1998). Stromelysin 3: an independent prognostic factor for relapse-free survival in node-positive breast cancer and demonstration of novel breast carcinoma cell expression. *Am. J. Pathol.* 152, 721–728.
- Ahn, Y.-O., Kim, S., Kim, T.M., Song, E.Y., Park, M.H., and Heo, D.S. (2013). Irradiated and activated autologous PBMCs induce expansion of highly cytotoxic human NK cells in vitro. *J. Immunother.* 36, 373–381.
- Akatsuka, A., Ito, M., Yamauchi, C., Ochiai, A., Yamamoto, K., and Matsumoto, N. (2010). Tumor cells of non-hematopoietic and hematopoietic origins express activation-induced C-type lectin, the ligand for killer cell lectin-like receptor F1. *International Immunology* 22, 783–790.
- Akbari, O. (2006). The role of iNKT cells in development of bronchial asthma: a translational approach from animal models to human. *Allergy* 61, 962–968.
- Akimoto, M., Hayashi, J.-I., Nakae, S., Saito, H., and Takenaga, K. (2016). Interleukin-33 enhances programmed oncosis of ST2L-positive low-metastatic cells in the tumour microenvironment of lung cancer. *Cell Death Dis* 7, e2057.
- Alexandre, Y.O., Ghilas, S., Sanchez, C., Le Bon, A., Crozat, K., and Dalod, M. (2016). XCR1+ dendritic cells promote memory CD8+ T cell recall upon secondary infections with *Listeria monocytogenes* or certain viruses. *J. Exp. Med.* 213, 75–92.
- Ali, S., Mohs, A., Thomas, M., Klare, J., Ross, R., Schmitz, M.L., and Martin, M.U. (2011). The dual function cytokine IL-33 interacts with the transcription factor NF- κ B to dampen NF- κ B-stimulated gene transcription. *J. Immunol.* 187, 1609–1616.
- Ali, T.H., Pisanti, S., Ciaglia, E., Mortarini, R., Anichini, A., Garofalo, C., Tallero, R., Santinami, M., Gulletta, E., Ietto, C., et al. (2014). Enrichment of CD56(dim)KIR + CD57 + highly cytotoxic NK cells in tumour-infiltrated lymph nodes of melanoma patients. *Nat Commun* 5, 5639.
- Alizadeh, D., Zhang, L., Brown, C.E., Farrukh, O., Jensen, M.C., and Badie, B. (2010). Induction of anti-glioma natural killer cell response following multiple low-dose intracerebral CpG therapy. *Clin. Cancer Res.* 16, 3399–3408.
- Allakhverdi, Z., Smith, D.E., Comeau, M.R., and Delespesse, G. (2007). Cutting edge: The ST2 ligand IL-33 potently activates and drives maturation of human mast cells. *J. Immunol.* 179, 2051–2054.
- Allan, D.S.J., Rybalov, B., Awong, G., Zúñiga-Pflücker, J.C., Kopcow, H.D., Carlyle, J.R., and Strominger, J.L. (2010). TGF- β affects development and differentiation of human natural killer cell subsets. *European Journal of Immunology* 40, 2289–2295.
- Almishri, W., Santodomingo-Garzon, T., Le, T., Stack, D., Mody, C.H., and Swain, M.G. (2016). TNF α Augments Cytokine-Induced NK Cell IFN γ Production through TNFR2. *JIN* 8, 617–629.
- Alnabhan, R., Madrigal, A., and Saudemont, A. (2015). Differential activation of cord blood and peripheral blood natural killer cells by cytokines. *Cytotherapy* 17, 73–85.
- Alsharifi, M., Lobigs, M., Simon, M.M., Kersten, A., Müller, K., Koskinen, A., Lee, E., and Müllbacher, A. (2006). NK cell-mediated immunopathology during an acute viral infection of the CNS. *Eur. J. Immunol.* 36, 887–896.
- Alvarez, F., Istomine, R., Shourian, M., Pavey, N., Al-Aubodah, T.A.-F., Qureshi, S., Fritz, J.H., and Piccirillo, C.A. (2019a). The alarmins IL-1 and IL-33 differentially regulate the functional specialisation of Foxp3 + regulatory T cells during mucosal inflammation. *Mucosal Immunology* 12, 746–760.
- Alvarez, M., Simonetta, F., Baker, J., Pierini, A., Wenokur, A.S., Morrison, A.R., Murphy, W.J., and Negrin, R.S. (2019b). Regulation of murine NK cell exhaustion through the activation of the DNA damage repair pathway. *JCI Insight* 5.
- Alves-Filho, J.C., Sônego, F., Souto, F.O., Freitas, A., Verri, W.A., Auxiliadora-Martins, M., Basile-Filho, A., McKenzie, A.N., Xu, D., Cunha, F.Q., et al. (2010). Interleukin-33 attenuates sepsis by enhancing neutrophil influx to the site of infection. *Nat. Med.* 16, 708–712.
- Ameri, A.H., Moradi Tuchayi, S., Zaalberg, A., Park, J.H., Ngo, K.H., Li, T., Lopez, E., Colonna, M., Lee, R.T., Mino-Kenudson, M., et al. (2019). IL-33/regulatory T cell axis triggers the development of a tumor-promoting immune environment in chronic inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 116, 2646–2651.

- Andersson, P., Yang, Y., Hosaka, K., Zhang, Y., Fischer, C., Braun, H., Liu, S., Yu, G., Liu, S., Beyaert, R., et al. (2018). Molecular mechanisms of IL-33-mediated stromal interactions in cancer metastasis. *JCI Insight* *3*, e122375.
- 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.
- Andrade, F., Fellows, E., Jenne, D.E., Rosen, A., and Young, C.S.H. (2007). Granzyme H destroys the function of critical adenoviral proteins required for viral DNA replication and granzyme B inhibition. *EMBO J* *26*, 2148–2157.
- Andrade, L.F. de, Lu, Y., Luoma, A., Ito, Y., Pan, D., Pyrdol, J.W., Yoon, C.H., Yuan, G.-C., and Wucherpfennig, K.W. (2019). Discovery of specialized NK cell populations infiltrating human melanoma metastases. *JCI Insight* *4*.
- Andrade, M.V., Iwaki, S., Ropert, C., Gazzinelli, R.T., Cunha-Melo, J.R., and Beaven, M.A. (2011). Amplification of cytokine production through synergistic activation of NFAT and AP-1 following stimulation of mast cells with antigen and IL-33. *European Journal of Immunology* *41*, 760–772.
- 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.
- Andreone, S., Spadaro, F., Buccione, C., Mancini, J., Tinari, A., Sestili, P., Gambardella, A.R., Lucarini, V., Ziccheddu, G., Parolini, I., et al. (2019). IL-33 Promotes CD11b/CD18-Mediated Adhesion of Eosinophils to Cancer Cells and Synapse-Polarized Degranulation Leading to Tumor Cell Killing. *Cancers (Basel)* *11*.
- Anfossi, N., André, P., Guida, S., Falk, C.S., Roetynck, S., Stewart, C.A., Bresó, 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.
- Ansari, M.A., Singh, V.V., Dutta, S., Veetil, M.V., Dutta, D., Chikoti, L., Lu, J., Everly, D., and Chandran, B. (2013). Constitutive interferon-inducible protein 16-inflammasome activation during Epstein-Barr virus latency I, II, and III in B and epithelial cells. *J. Virol.* *87*, 8606–8623.
- Antonangeli, F., Soriani, A., Ricci, B., Ponzetta, A., Benigni, G., Morrone, S., Bernardini, G., and Santoni, A. (2016). Natural killer cell recognition of in vivo drug-induced senescent multiple myeloma cells. *Oncolmmunology* *5*, e1218105.
- Aoki, S., Hayakawa, M., Ozaki, H., Takezako, N., Obata, H., Ibaraki, N., Tsuru, T., Tominaga, S.-I., and Yanagisawa, K. (2010). ST2 gene expression is proliferation-dependent and its ligand, IL-33, induces inflammatory reaction in endothelial cells. *Mol. Cell. Biochem.* *335*, 75–81.
- Ardolino, M., Azimi, C.S., Iannello, A., Trevino, T.N., Horan, L., Zhang, L., Deng, W., 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.
- 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.
- Arnon, T.I., Achdout, H., Levi, O., Markel, G., Saleh, N., Katz, G., Gazit, R., Gonen-Gross, T., Hanna, J., Nahari, E., et al. (2005). Inhibition of the Nkp30 activating receptor by pp65 of human cytomegalovirus. *Nat. Immunol.* *6*, 515–523.
- Arpaia, N., Green, J.A., Moltedo, B., Arvey, A., Hemmers, S., Yuan, S., Treuting, P.M., and Rudensky, A.Y. (2015). A Distinct Function of Regulatory T Cells in Tissue Protection. *Cell* *162*, 1078–1089.
- Ashkenazi, A., Pai, R.C., Fong, S., Leung, S., Lawrence, D.A., Marsters, S.A., Blackie, C., Chang, L., McMurtrey, A.E., Hebert, A., et al. (1999). Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J. Clin. Invest.* *104*, 155–162.
- Atkins, M.B., Lotze, M.T., Dutcher, J.P., Fisher, R.I., Weiss, G., Margolin, K., Abrams, J., Sznol, M., Parkinson, D., Hawkins, M., et al. (1999). High-dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993. *J. Clin. Oncol.* *17*, 2105–2116.
- Ayello, J., Hochberg, J., Flower, A., Chu, Y., Baxi, L.V., Quish, W., van de Ven, C., and Cairo, M.S. (2017). Genetically re-engineered K562 cells significantly expand and functionally activate cord blood natural killer cells: Potential for adoptive cellular immunotherapy. *Exp. Hematol.* *46*, 38–47.
- Azizi, E., Carr, A.J., Plitas, G., Cornish, A.E., Konopacki, C., Prabhakaran, S., Nainys, J., Wu, K., Kisieliovas, V., Setty, M., et al. (2018). Single-Cell Map of Diverse Immune Phenotypes in the Breast Tumor Microenvironment. *Cell* *174*, 1293-1308.e36.
- Azuma, M., Cayabyab, M., Buck, D., Phillips, J.H., and Lanier, L.L. (1992). Involvement of CD28 in MHC-unrestricted cytotoxicity mediated by a human natural killer leukemia cell line. *J. Immunol.* *149*, 1115–1123.
- Bachanova, V., Burns, L.J., McKenna, D.H., Curtsinger, J., Panoskaltsis-Mortari, A., Lindgren, B.R., Cooley, S., Weisdorf, D., and Miller, J.S. (2010). Allogeneic natural killer cells for refractory lymphoma. *Cancer Immunol. Immunother.* *59*, 1739–1744.

- Bachanova, V., Cooley, S., Defor, T.E., Verneris, M.R., Zhang, B., McKenna, D.H., Curtsinger, J., Panoskaltis-Mortari, A., Lewis, D., Hippen, K., et al. (2014). Clearance of acute myeloid leukemia by haploidentical natural killer cells is improved using IL-2 diphtheria toxin fusion protein. *Blood* *123*, 3855–3863.
- Bacon, C.M., Petricoin, E.F., Ortaldo, J.R., Rees, R.C., Lerner, A.C., Johnston, J.A., and O’Shea, J.J. (1995). Interleukin 12 induces tyrosine phosphorylation and activation of STAT4 in human lymphocytes. *PNAS* *92*, 7307–7311.
- Bae, S., Kang, T., Hong, J., Lee, S., Choi, J., Jhun, H., Kwak, A., Hong, K., Kim, E., Jo, S., et al. (2012). Contradictory Functions (Activation/Termination) of Neutrophil Proteinase 3 Enzyme (PR3) in Interleukin-33 Biological Activity. *J Biol Chem* *287*, 8205–8213.
- Baekkevold, E.S., Roussigné, M., Yamanaka, T., Johansen, F.-E., Jahnsen, F.L., Amalric, F., Brandtzaeg, P., Erard, M., Haraldsen, G., and Girard, J.-P. (2003). Molecular characterization of NF-HEV, a nuclear factor preferentially expressed in human high endothelial venules. *Am. J. Pathol.* *163*, 69–79.
- Baessler, T., Charton, J.E., Schmiedel, B.J., Grünebach, F., Krusch, M., Wacker, A., Rammensee, H.-G., and Salih, H.R. (2010). CD137 ligand mediates opposite effects in human and mouse NK cells and impairs NK-cell reactivity against human acute myeloid leukemia cells. *Blood* *115*, 3058–3069.
- Baghdadi, M., Nagao, H., Yoshiyama, H., Akiba, H., Yagita, H., Dosaka-Akita, H., and Jinushi, M. (2013). Combined blockade of TIM-3 and TIM-4 augments cancer vaccine efficacy against established melanomas. *Cancer Immunol. Immunother.* *62*, 629–637.
- Bagot, M., Moretta, A., Sivori, S., Biassoni, R., Cantoni, C., Bottino, C., Boumsell, L., and Bensussan, A. (2001). CD4(+) cutaneous T-cell lymphoma cells express the p140-killer cell immunoglobulin-like receptor. *Blood* *97*, 1388–1391.
- Bagot, M., Porcu, P., Marie-Cardine, A., Battistella, M., William, B.M., Vermeer, M., Whittaker, S., Rotolo, F., Ram-Wolff, C., Khodadoust, M.S., et al. (2019). IPH4102, a first-in-class anti-KIR3DL2 monoclonal antibody, in patients with relapsed or refractory cutaneous T-cell lymphoma: an international, first-in-human, open-label, phase 1 trial. *Lancet Oncol.* *20*, 1160–1170.
- Bajénoff, M., Breart, B., Huang, A.Y.C., Qi, H., Cazareth, J., Braud, V.M., Germain, R.N., and Glaichenhaus, N. (2006). Natural killer cell behavior in lymph nodes revealed by static and real-time imaging. *J. Exp. Med.* *203*, 619–631.
- Balaji, G.R., Aguilar, O.A., Tanaka, M., Shingu-Vazquez, M.A., Fu, Z., Gully, B.S., Lanier, L.L., Carlyle, J.R., Rossjohn, J., and Berry, R. (2018). Recognition of host Clr-b by the inhibitory NKR-P1B receptor provides a basis for missing-self recognition. *Nat Commun* *9*.
- 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.
- 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.
- Balza, E., Carnemolla, B., Mortara, L., Castellani, P., Soncini, D., Accolla, R.S., and Borsi, L. (2010). Therapy-induced antitumor vaccination in neuroblastomas by the combined targeting of IL-2 and TNF α . *International Journal of Cancer* *127*, 101–110.
- Bancroft, G.J., Schreiber, R.D., and Unanue, E.R. (1991). Natural immunity: a T-cell-independent pathway of macrophage activation, defined in the scid mouse. *Immunol. Rev.* *124*, 5–24.
- Bandara, G., Beaven, M.A., Olivera, A., Gilfillan, A.M., and Metcalfe, D.D. (2015). Activated mast cells synthesize and release soluble ST2—a decoy receptor for IL-33. *European Journal of Immunology* *45*, 3034–3044.
- Banyard, J., Bao, L., Hofer, M.D., Zurakowski, D., Spivey, K.A., Feldman, A.S., Hutchinson, L.M., Kuefer, R., Rubin, M.A., and Zetter, B.R. (2007). Collagen XXIII expression is associated with prostate cancer recurrence and distant metastases. *Clin. Cancer Res.* *13*, 2634–2642.
- Barber, D.F., Faure, M., and Long, E.O. (2004). LFA-1 contributes an early signal for NK cell cytotoxicity. *J. Immunol.* *173*, 3653–3659.
- Barnes, P.J. (2011). Pathophysiology of allergic inflammation. *Immunological Reviews* *242*, 31–50.
- Barry, K.C., Hsu, J., Broz, M.L., Cueto, F.J., Binnewies, M., Combes, A.J., Nelson, A.E., Loo, K., Kumar, R., Rosenblum, M.D., et al. (2018). A natural killer-dendritic cell axis defines checkpoint therapy-responsive tumor microenvironments. *Nat. Med.* *24*, 1178–1191.
- Barry, M., Heibein, J.A., Pinkoski, M.J., Lee, S.F., Moyer, R.W., Green, D.R., and Bleackley, R.C. (2000). Granzyme B short-circuits the need for caspase 8 activity during granule-mediated cytotoxic T-lymphocyte killing by directly cleaving Bid. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 3781–3794.
- Basset, P., Belloq, J.P., Wolf, C., Stoll, I., Hutin, P., Limacher, J.M., Podhajcer, O.L., Chenard, M.P., Rio, M.C., and Chambon, P. (1990). A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas. *Nature* *348*, 699–704.

- Battistella, M., Janin, A., Jean-Louis, F., Collomb, C., Leboeuf, C., Sicard, H., Bonnafous, C., Dujardin, A., Ram-Wolff, C., Kadin, M.E., et al. (2016). KIR3DL2 (CD158k) is a potential therapeutic target in primary cutaneous anaplastic large-cell lymphoma. *Br. J. Dermatol.* *175*, 325–333.
- Battistella, M., Leboeuf, C., Ram-Wolff, C., Hurabielle, C., Bonnafous, C., Sicard, H., Bensussan, A., Bagot, M., and Janin, A. (2017). KIR3DL2 expression in cutaneous T-cell lymphomas: expanding the spectrum for KIR3DL2 targeting. *Blood* *130*, 2900–2902.
- Battistini, L., Borsellino, G., Sawicki, G., Poccia, F., Salvetti, M., Ristori, G., and Brosnan, C.F. (1997). Phenotypic and cytokine analysis of human peripheral blood gamma delta T cells expressing NK cell receptors. *J. Immunol.* *159*, 3723–3730.
- 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.
- Baumann, C., Bonilla, W.V., Fröhlich, A., Helmstetter, C., Peine, M., Hegazy, A.N., Pinschewer, D.D., and Löhning, M. (2015). T-bet- and STAT4-dependent IL-33 receptor expression directly promotes antiviral Th1 cell responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *112*, 4056–4061.
- Baume, D.M., Robertson, M.J., Levine, H., Manley, T.J., Schow, P.W., and Ritz, J. (1992). Differential responses to interleukin 2 define functionally distinct subsets of human natural killer cells. *Eur. J. Immunol.* *22*, 1–6.
- Baxevas, C.N., Voutsas, I.F., Tsitsilonis, O.E., Tsiatas, M.L., Gritzapis, A.D., and Papamichail, M. (2000). Compromised anti-tumor responses in tumor necrosis factor-alpha knockout mice. *Eur. J. Immunol.* *30*, 1957–1966.
- Beano, A., Signorino, E., Evangelista, A., Brusa, D., Mistrangelo, M., Polimeni, M.A., Spadi, R., Donadio, M., Ciuffreda, L., and Matera, L. (2008). Correlation between NK function and response to trastuzumab in metastatic breast cancer patients. *J. Transl Med* *6*, 25.
- Beaudouin, J., Liesche, C., Aschenbrenner, S., Hörner, M., and Eils, R. (2013). Caspase-8 cleaves its substrates from the plasma membrane upon CD95-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* *20*, 599–610.
- Becerra, A., Warke, R.V., de Bosch, N., Rothman, A.L., and Bosch, I. (2008). Elevated levels of soluble ST2 protein in dengue virus infected patients. *Cytokine* *41*, 114–120.
- Becknell, B., and Caligiuri, M.A. (2005). Interleukin-2, interleukin-15, and their roles in human natural killer cells. *Adv. Immunol.* *86*, 209–239.
- Beffinger, M., Tallón de Lara, P., Tugues, S., Vermeer, M., Montagnolo, Y., Ohs, I., Cecconi, V., Lucchiari, G., Gagliardi, A., Misljencevic, N., et al. (2018). CSF1R-dependent myeloid cells are required for NK-mediated control of metastasis. *JCI Insight* *3*.
- Beldi-Ferchiou, A., Lambert, M., Dogniaux, S., Vély, F., Vivier, E., Olive, D., Dupuy, S., Levasseur, F., Zucman, D., Lebbé, C., et al. (2016). PD-1 mediates functional exhaustion of activated NK cells in patients with Kaposi sarcoma. *Oncotarget* *7*, 72961–72977.
- Belisle, J.A., Horibata, S., Jennifer, G.A.A., Petrie, S., Kapur, A., André, S., Gabius, H.-J., Rancourt, C., Connor, J., Paulson, J.C., et al. (2010). Identification of Siglec-9 as the receptor for MUC16 on human NK cells, B cells, and monocytes. *Mol. Cancer* *9*, 118.
- Bellone, G., Aste-Amezaga, M., Trinchieri, G., and Rodeck, U. (1995). Regulation of NK cell functions by TGF-beta 1. *J. Immunol.* *155*, 1066–1073.
- Beltrán, C.J., Núñez, L.E., Díaz-Jiménez, D., Farfan, N., Candia, E., Heine, C., López, F., González, M.J., Quera, R., and Hermoso, M.A. (2010). Characterization of the novel ST2/IL-33 system in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* *16*, 1097–1107.
- Bennett, I.M., Zatschina, O., Zamai, L., Azzoni, L., Mikheeva, T., and Perussia, B. (1996). Definition of a natural killer NKR-P1A+/CD56-/CD16- functionally immature human NK cell subset that differentiates in vitro in the presence of interleukin 12. *J. Exp. Med.* *184*, 1845–1856.
- 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.
- Benson, D.M., Bakan, C.E., Zhang, S., Collins, S.M., Liang, J., Srivastava, S., Hofmeister, C.C., Efebera, Y., Andre, P., Romagne, F., et al. (2011). IPH2101, a novel anti-inhibitory KIR antibody, and lenalidomide combine to enhance the natural killer cell versus multiple myeloma effect. *Blood* *118*, 6387–6391.
- Berdeja, J.G., Hess, A., Lucas, D.M., O'Donnell, P., Ambinder, R.F., Diehl, L.F., Carter-Brookings, D., Newton, S., and Flinn, I.W. (2007). Systemic interleukin-2 and adoptive transfer of lymphokine-activated killer cells improves antibody-dependent cellular cytotoxicity in patients with relapsed B-cell lymphoma treated with rituximab. *Clin. Cancer Res.* *13*, 2392–2399.
- van Bergen, J., Kooy-Winkelaar, E.M.C., van Dongen, H., van Gaalen, F.A., Thompson, A., Huizinga, T.W.J., Feltkamp, M.C.W., Toes, R.E.M., and Koning, F. (2009). Functional killer Ig-like receptors on human memory CD4+ T cells specific for cytomegalovirus. *J. Immunol.* *182*, 4175–4182.
- Bergis, D., Kassis, V., Ranglack, A., Koeberle, V., Piiper, A., Kronenberger, B., Zeuzem, S., Waidmann, O., and Radeke, H.H. (2013). High Serum Levels of the Interleukin-33 Receptor Soluble ST2 as a Negative Prognostic Factor in Hepatocellular Carcinoma. *Transl Oncol* *6*, 311–318.

- Berrien-Elliott, M.M., Wagner, J.A., and Fehniger, T.A. (2015). Human Cytokine-Induced Memory-Like Natural Killer Cells. *J Innate Immun* 7, 563–571.
- Bertheloot, D., and Latz, E. (2017). HMGB1, IL-1 α , IL-33 and S100 proteins: dual-function alarmins. *Cell. Mol. Immunol.* 14, 43–64.
- Besnard, A.-G., Togbe, D., Guillou, N., Erard, F., Quesniaux, V., and Ryffel, B. (2011). IL-33-activated dendritic cells are critical for allergic airway inflammation. *Eur. J. Immunol.* 41, 1675–1686.
- Besnard, A.-G., Guabiraba, R., Niedbala, W., Palomo, J., Reverchon, F., Shaw, T.N., Couper, K.N., Ryffel, B., and Liew, F.Y. (2015). IL-33-mediated protection against experimental cerebral malaria is linked to induction of type 2 innate lymphoid cells, M2 macrophages and regulatory T cells. *PLoS Pathog.* 11, e1004607.
- Bessard, A., Solé, V., Bouchaud, G., Quémener, A., and Jacques, Y. (2009). High antitumor activity of RLI, an interleukin-15 (IL-15)–IL-15 receptor α fusion protein, in metastatic melanoma and colorectal cancer. *Mol Cancer Ther* 8, 2736–2745.
- Béziat, V., Dalgard, O., Asselah, T., Halfon, P., Bedossa, P., Boudifa, A., Hervier, B., Theodorou, I., Martinot, M., Debré, P., et al. (2012). CMV drives clonal expansion of NKG2C+ NK cells expressing self-specific KIRs in chronic hepatitis patients. *European Journal of Immunology* 42, 447–457.
- Bezman, N.A., Kim, C.C., Sun, J.C., Min-Oo, G., Hendricks, D.W., Kamimura, Y., Best, J.A., Goldrath, A.W., Lanier, L.L., and Immunological Genome Project Consortium (2012). Molecular definition of the identity and activation of natural killer cells. *Nat. Immunol.* 13, 1000–1009.
- Bezman, N.A., Jhatakia, A., Kearney, A.Y., Brender, T., Maurer, M., Henning, K., Jenkins, M.R., Rogers, A.J., Neeson, P.J., Korman, A.J., et al. (2017). PD-1 blockade enhances elotuzumab efficacy in mouse tumor models. *Blood Adv* 1, 753–765.
- Bhat, R., and Watzl, C. (2007). Serial killing of tumor cells by human natural killer cells--enhancement by therapeutic antibodies. *PLoS ONE* 2, e326.
- Bihl, F., Pecheur, J., Bréart, B., Poupon, G., Cazareth, J., Julia, V., Glaichenhaus, N., and Braud, V.M. (2010). Primed antigen-specific CD4+ T cells are required for NK cell activation in vivo upon Leishmania major infection. *J. Immunol.* 185, 2174–2181.
- Birchmeier, W., Weidner, K.M., Hülsken, J., and Behrens, J. (1993). Molecular mechanisms leading to cell junction (cadherin) deficiency in invasive carcinomas. *Semin. Cancer Biol.* 4, 231–239.
- Björklund, Å.K., Forkel, M., Picelli, S., Konya, V., Theorell, J., Friberg, D., Sandberg, R., and Mjösberg, J. (2016). The heterogeneity of human CD127(+) innate lymphoid cells revealed by single-cell RNA sequencing. *Nat. Immunol.* 17, 451–460.
- Björkström, N.K., Riese, P., Heuts, F., Andersson, S., Fauriat, C., Ivarsson, M.A., Björklund, A.T., Flodström-Tullberg, M., Michaëlsson, J., Rottenberg, M.E., et al. (2010). Expression patterns of NKG2A, KIR, and CD57 define a process of CD56dim NK-cell differentiation uncoupled from NK-cell education. *Blood* 116, 3853–3864.
- Björkström, N.K., Lindgren, T., Stoltz, M., Fauriat, C., Braun, M., Evander, M., Michaëlsson, J., Malmberg, K.-J., Klingström, J., Ahlm, C., et al. (2011). Rapid expansion and long-term persistence of elevated NK cell numbers in humans infected with hantavirus. *J. Exp. Med.* 208, 13–21.
- Björkström, N.K., Béziat, V., Cichocki, F., Liu, L.L., Levine, J., Larsson, S., Koup, R.A., Anderson, S.K., Ljunggren, H.-G., and Malmberg, K.-J. (2012). CD8 T cells express randomly selected KIRs with distinct specificities compared with NK cells. *Blood* 120, 3455–3465.
- Blank, C.U., Haining, W.N., Held, W., Hogan, P.G., Kallies, A., Lugli, E., Lynn, R.C., Philip, M., Rao, A., Restifo, N.P., et al. (2019). Defining 'T cell exhaustion.' *Nat Rev Immunol* 19, 665–674.
- Blatner, N.R., Bonertz, A., Beckhove, P., Cheon, E.C., Krantz, S.B., Strouch, M., Weitz, J., Koch, M., Halverson, A.L., Bentrem, D.J., et al. (2010). In colorectal cancer mast cells contribute to systemic regulatory T-cell dysfunction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 6430–6435.
- Bléry, M., Olcese, L., and Vivier, E. (2000). Early signaling via inhibitory and activating NK receptors. *Human Immunology* 61, 51–64.
- Blom, L., and Poulsen, L.K. (2012). IL-1 family members IL-18 and IL-33 upregulate the inflammatory potential of differentiated human Th1 and Th2 cultures. *J. Immunol.* 189, 4331–4337.
- Blom, L., Poulsen, B.C., Jensen, B.M., Hansen, A., and Poulsen, L.K. (2011). IL-33 induces IL-9 production in human CD4+ T cells and basophils. *PLoS ONE* 6, e21695.
- Bluman, E.M., Bartynski, K.J., Avalos, B.R., and Caligiuri, M.A. (1996). Human natural killer cells produce abundant macrophage inflammatory protein-1 alpha in response to monocyte-derived cytokines. *J. Clin. Invest.* 97, 2722–2727.
- Boles, K.S., Barten, R., Kumaresan, P.R., Trowsdale, J., and Mathew, P.A. (1999). Cloning of a new lectin-like receptor expressed on human NK cells. *Immunogenetics* 50, 1–7.

- Bolovan-Fritts, C.A., and Spector, S.A. (2008). Endothelial damage from cytomegalovirus-specific host immune response can be prevented by targeted disruption of fractalkine-CX3CR1 interaction. *Blood* *111*, 175–182.
- Bommarito, D., Martin, A., Forcade, E., Nastke, M.-D., Ritz, J., and Bellucci, R. (2016). Enhancement of tumor cell susceptibility to natural killer cell activity through inhibition of the PI3K signaling pathway. *Cancer Immunol. Immunother.* *65*, 355–366.
- Bonilla, W.V., Fröhlich, A., Senn, K., Kallert, S., Fernandez, M., Johnson, S., Kreutzfeldt, M., Hegazy, A.N., Schrick, C., Fallon, P.G., et al. (2012). The Alarmin Interleukin-33 Drives Protective Antiviral CD8+ T Cell Responses. *Science* *335*, 984–989.
- Borg, C., Terme, M., Taïeb, J., Ménard, C., Flament, C., Robert, C., Maruyama, K., Wakasugi, H., Angevin, E., Thielemans, K., et al. (2004). Novel mode of action of c-kit tyrosine kinase inhibitors leading to NK cell-dependent antitumor effects. *J. Clin. Invest.* *114*, 379–388.
- Borrego, F., Ulbrecht, M., Weiss, E.H., Coligan, J.E., and Brooks, A.G. (1998). Recognition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-E complexed with HLA class I signal sequence-derived peptides by CD94/NG2 confers protection from natural killer cell-mediated lysis. *J. Exp. Med.* *187*, 813–818.
- Borrego, F., Alonso, M.C., Galiani, M.D., Carracedo, J., Ramirez, R., Ostos, B., Peña, J., and Solana, R. (1999). NK phenotypic markers and IL2 response in NK cells from elderly people. *Exp. Gerontol.* *34*, 253–265.
- 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.
- Bottino, C., Castriconi, R., Pende, D., Rivera, P., Nanni, M., Carnemolla, B., Cantoni, C., Grassi, J., Marcenaro, S., Reymond, N., et al. (2003). Identification of PVRL2 (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule. *J. Exp. Med.* *198*, 557–567.
- Bouffi, C., Rochman, M., Zust, C.B., Stucke, E.M., Kartashov, A., Fulkerson, P.C., Barski, A., and Rothenberg, M.E. (2013). IL-33 markedly activates murine eosinophils by an NF- κ B-dependent mechanism differentially dependent upon an IL-4-driven autoinflammatory loop. *J. Immunol.* *191*, 4317–4325.
- Bourgeois, E., Van, L.P., Samson, M., Diem, S., Barra, A., Roga, S., Gombert, J.-M., Schneider, E., Dy, M., Gourdy, P., et al. (2009). The pro-Th2 cytokine IL-33 directly interacts with invariant NKT and NK cells to induce IFN- γ production. *Eur. J. Immunol.* *39*, 1046–1055.
- Boyman, O., and Sprent, J. (2012). The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* *12*, 180–190.
- Bradley, M., Zeytun, A., Rafi-Janajreh, A., Nagarkatti, P.S., and Nagarkatti, M. (1998). Role of spontaneous and interleukin-2-induced natural killer cell activity in the cytotoxicity and rejection of Fas+ and Fas- tumor cells. *Blood* *92*, 4248–4255.
- Brady, J., Hayakawa, Y., Smyth, M.J., and Nutt, S.L. (2004). IL-21 induces the functional maturation of murine NK cells. *J. Immunol.* *172*, 2048–2058.
- Brady, J., Carotta, S., Thong, R.P.L., Chan, C.J., Hayakawa, Y., Smyth, M.J., and Nutt, S.L. (2010). The interactions of multiple cytokines control NK cell maturation. *J. Immunol.* *185*, 6679–6688.
- 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.
- Brauner, H., Elemans, M., Lemos, S., Broberger, C., Holmberg, D., Flodström-Tullberg, M., Kärre, K., and Höglund, P. (2010). Distinct phenotype and function of NK cells in the pancreas of nonobese diabetic mice. *J. Immunol.* *184*, 2272–2280.
- Brenchley, J.M., Karandikar, N.J., Betts, M.R., Ambrozak, D.R., Hill, B.J., Crotty, L.E., Casazza, J.P., Kuruppu, J., Migueles, S.A., Connors, M., et al. (2003). Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8+ T cells. *Blood* *101*, 2711–2720.
- Brestoff, J.R., Kim, B.S., Saenz, S.A., Stine, R.R., Monticelli, L.A., Sonnenberg, G.F., Thome, J.J., Farber, D.L., Lutfy, K., Seale, P., et al. (2015). Group 2 innate lymphoid cells promote beiging of white adipose tissue and limit obesity. *Nature* *519*, 242–246.
- Briard, D., Brouty-Boyé, D., Azzarone, B., and Jasmin, C. (2002). Fibroblasts from human spleen regulate NK cell differentiation from blood CD34(+) progenitors via cell surface IL-15. *J. Immunol.* *168*, 4326–4332.
- Brint, E.K., Xu, D., Liu, H., Dunne, A., McKenzie, A.N.J., O'Neill, L.A.J., and Liew, F.Y. (2004). ST2 is an inhibitor of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor 4 signaling and maintains endotoxin tolerance. *Nature Immunology* *5*, 373–379.
- Brodin, P., Kärre, K., and Höglund, P. (2009). NK cell education: not an on-off switch but a tunable rheostat. *Trends Immunol.* *30*, 143–149.

- van den Broek, M.F., Kägi, D., Zinkernagel, R.M., and Hengartner, H. (1995). Perforin dependence of natural killer cell-mediated tumor control in vivo. *Eur. J. Immunol.* *25*, 3514–3516.
- Broz, M.L., Binnewies, M., Boldajipour, B., Nelson, A.E., Pollack, J.L., Erle, D.J., Barczak, A., Rosenblum, M.D., Daud, A., Barber, D.L., et al. (2014). Dissecting the tumor myeloid compartment reveals rare activating antigen-presenting cells critical for T cell immunity. *Cancer Cell* *26*, 638–652.
- Brunner, M., Krenn, C., Roth, G., Moser, B., Dworschak, M., Jensen-Jarolim, E., Spittler, A., Sautner, T., Bonaros, N., Wolner, E., et al. (2004). Increased levels of soluble ST2 protein and IgG1 production in patients with sepsis and trauma. *Intensive Care Med* *30*, 1468–1473.
- Brunner, S.M., Schiechl, G., Falk, W., Schlitt, H.J., Geissler, E.K., and Fichtner-Feigl, S. (2011). Interleukin-33 prolongs allograft survival during chronic cardiac rejection. *Transpl. Int.* *24*, 1027–1039.
- Brunner, S.M., Rubner, C., Kesselring, R., Martin, M., Griesshammer, E., Ruemmele, P., Stempf, T., Teufel, A., Schlitt, H.J., and Fichtner-Feigl, S. (2015). Tumor-infiltrating, interleukin-33-producing effector-memory CD8(+) T cells in resected hepatocellular carcinoma prolong patient survival. *Hepatology* *61*, 1957–1967.
- 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.
- Burns, L.J., Weisdorf, D.J., DeFor, T.E., Vesole, D.H., Repka, T.L., Blazar, B.R., Burger, S.R., Panoskaltis-Mortari, A., Keever-Taylor, C.A., Zhang, M.-J., et al. (2003). IL-2-based immunotherapy after autologous transplantation for lymphoma and breast cancer induces immune activation and cytokine release: a phase I/II trial. *Bone Marrow Transplant.* *32*, 177–186.
- Burzyn, D., Kuswanto, W., Kolodin, D., Shadrach, J.L., Cerletti, M., Jang, Y., Sefik, E., Tan, T.G., Wagers, A.J., Benoist, C., et al. (2013). A special population of regulatory T cells potentiates muscle repair. *Cell* *155*, 1282–1295.
- Byers, D.E., Alexander-Brett, J., Patel, A.C., Agapov, E., Dang-Vu, G., Jin, X., Wu, K., You, Y., Alevy, Y., Girard, J.-P., et al. (2013). Long-term IL-33–producing epithelial progenitor cells in chronic obstructive lung disease. *J Clin Invest* *123*, 3967–3982.
- Cabrera, T., Fernandez, M.A., Sierra, A., Garrido, A., Herruzo, A., Escobedo, A., Fabra, A., and Garrido, F. (1996). High frequency of altered HLA class I phenotypes in invasive breast carcinomas. *Human Immunology* *50*, 127–134.
- Cabrera, T., Collado, A., Fernandez, M.A., Ferron, A., Sancho, J., Ruiz-Cabello, F., and Garrido, F. (1998). High frequency of altered HLA class I phenotypes in invasive colorectal carcinomas. *Tissue Antigens* *52*, 114–123.
- Caligiuri, M.A., Zmuidzinas, A., Manley, T.J., Levine, H., Smith, K.A., and Ritz, J. (1990). Functional consequences of interleukin 2 receptor expression on resting human lymphocytes. Identification of a novel natural killer cell subset with high affinity receptors. *J. Exp. Med.* *171*, 1509–1526.
- Campbell, J.J., Qin, S., Unutmaz, D., Soler, D., Murphy, K.E., Hodge, M.R., Wu, L., and Butcher, E.C. (2001). Unique subpopulations of CD56+ NK and NK-T peripheral blood lymphocytes identified by chemokine receptor expression repertoire. *J. Immunol.* *166*, 6477–6482.
- Campbell, K.S., Cohen, A.D., and Pazina, T. (2018). Mechanisms of NK Cell Activation and Clinical Activity of the Therapeutic SLAMF7 Antibody, Elotuzumab in Multiple Myeloma. *Front Immunol* *9*, 2551.
- Cao, K., Liao, X., Lu, J., Yao, S., Wu, F., Zhu, X., Shi, D., Wen, S., Liu, L., and Zhou, H. (2018). IL-33/ST2 plays a critical role in endothelial cell activation and microglia-mediated neuroinflammation modulation. *J Neuroinflammation* *15*, 136.
- Carayannopoulos, L.N., Naidenko, O.V., Fremont, D.H., and Yokoyama, W.M. (2002). Cutting edge: murine UL16-binding protein-like transcript 1: a newly described transcript encoding a high-affinity ligand for murine NKG2D. *J. Immunol.* *169*, 4079–4083.
- Carbone, E., Ruggiero, G., Terrazzano, G., Palomba, C., Manzo, C., Fontana, S., Spits, H., Kärre, K., and Zappacosta, S. (1997). A new mechanism of NK cell cytotoxicity activation: the CD40-CD40 ligand interaction. *J. Exp. Med.* *185*, 2053–2060.
- Carlsten, M., Norell, H., Bryceson, Y.T., Poschke, I., Schedvins, K., Ljunggren, H.-G., Kiessling, R., and Malmberg, K.-J. (2009). Primary human tumor cells expressing CD155 impair tumor targeting by down-regulating DNAM-1 on NK cells. *J. Immunol.* *183*, 4921–4930.
- Carnemolla, B., Borsi, L., Balza, E., Castellani, P., Meazza, R., Berndt, A., Ferrini, S., Kosmehl, H., Neri, D., and Zardi, L. (2002). Enhancement of the antitumor properties of interleukin-2 by its targeted delivery to the tumor blood vessel extracellular matrix. *Blood* *99*, 1659–1665.
- Carrega, P., Morandi, B., Costa, R., Frumento, G., Forte, G., Altavilla, G., Ratto, G.B., Mingari, M.C., Moretta, L., and Ferlazzo, G. (2008). Natural killer cells infiltrating human nonsmall-cell lung cancer are enriched in CD56brightCD16– cells and display an impaired capability to kill tumor cells. *Cancer* *112*, 863–875.
- Carriere, V., Roussel, L., Ortega, N., Lacorre, D.-A., Americh, L., Aguilar, L., Bouche, G., and Girard, J.-P. (2007). IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *104*, 282–287.

- Carrington, M., and Alter, G. (2012). Innate immune control of HIV. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2, a007070.
- Carson, W.E., Haldar, S., Baiocchi, R.A., Croce, C.M., and Caligiuri, M.A. (1994a). The c-kit ligand suppresses apoptosis of human natural killer cells through the upregulation of bcl-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 7553–7557.
- Carson, W.E., Giri, J.G., Lindemann, M.J., Linett, M.L., Ahdieh, M., Paxton, R., Anderson, D., Eisenmann, J., Grabstein, K., and Caligiuri, M.A. (1994b). Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor. *J. Exp. Med.* 180, 1395–1403.
- Carson, W.E., Lindemann, M.J., Baiocchi, R., Linett, M., Tan, J.C., Chou, C.C., Narula, S., and Caligiuri, M.A. (1995). The functional characterization of interleukin-10 receptor expression on human natural killer cells. *Blood* 85, 3577–3585.
- Cartron, G., Dacheux, L., Salles, G., Solal-Celigny, P., Bardos, P., Colombat, P., and Watier, H. (2002). Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. *Blood* 99, 754–758.
- Casado, J.G., Pawelec, G., Morgado, S., Sanchez-Correa, B., Delgado, E., Gayoso, I., Duran, E., Solana, R., and Tarazona, R. (2009). Expression of adhesion molecules and ligands for activating and costimulatory receptors involved in cell-mediated cytotoxicity in a large panel of human melanoma cell lines. *Cancer Immunol. Immunother.* 58, 1517–1526.
- Castellino, F., Huang, A.Y., Altan-Bonnet, G., Stoll, S., Scheinecker, C., and Germain, R.N. (2006). Chemokines enhance immunity by guiding naive CD8+ T cells to sites of CD4+ T cell-dendritic cell interaction. *Nature* 440, 890–895.
- Castriconi, R., Dondero, A., Bellora, F., Moretta, L., Castellano, A., Locatelli, F., Corrias, M.V., Moretta, A., and Bottino, C. (2013). Neuroblastoma-derived TGF-β1 modulates the chemokine receptor repertoire of human resting NK cells. *J. Immunol.* 190, 5321–5328.
- Castro Alves, C., Terziyska, N., Grunert, M., Gündisch, S., Graubner, U., Quintanilla-Martinez, L., and Jeremias, I. (2012). Leukemia-initiating cells of patient-derived acute lymphoblastic leukemia xenografts are sensitive toward TRAIL. *Blood* 119, 4224–4227.
- Cayrol, C., and Girard, J.-P. (2009). The IL-1-like cytokine IL-33 is inactivated after maturation by caspase-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 9021–9026.
- Cayrol, C., Duval, A., Schmitt, P., Roga, S., Camus, M., Stella, A., Burlet-Schiltz, O., Gonzalez-de-Peredo, A., and Girard, J.-P. (2018). Environmental allergens induce allergic inflammation through proteolytic maturation of IL-33. *Nat. Immunol.* 19, 375–385.
- Cerwenka, A., Bakker, A.B., McClanahan, T., Wagner, J., Wu, J., Phillips, J.H., and Lanier, L.L. (2000). Retinoic acid early inducible genes define a ligand family for the activating NKG2D receptor in mice. *Immunity* 12, 721–727.
- Chaix, J., Tessmer, M.S., Hoebe, K., Fuséri, N., Ryffel, B., Dalod, M., Alexopoulou, L., Beutler, B., Brossay, L., Vivier, E., et al. (2008). Cutting Edge: Priming of NK Cells by IL-18. *The Journal of Immunology* 181, 1627–1631.
- Chakir, H., Lemay, A.M., and Webb, J.R. (2001). Cytokine expression by murine DX5+ cells in response to IL-12, IL-18, or the combination of IL-12 and IL-18. *Cell. Immunol.* 212, 71–81.
- Chalifour, A., Jeannin, P., Gauchat, J.-F., Blaecke, A., Malissard, M., N’Guyen, T., Thieblemont, N., and Delneste, Y. (2004). Direct bacterial protein PAMP recognition by human NK cells involves TLRs and triggers alpha-defensin production. *Blood* 104, 1778–1783.
- Chalifour, A., Scarpellino, L., Back, J., Brodin, P., Devèvre, E., Gros, F., Lévy, F., Leclercq, G., Höglund, P., Beermann, F., et al. (2009). A Role for cis Interaction between the Inhibitory Ly49A receptor and MHC class I for natural killer cell education. *Immunity* 30, 337–347.
- Chan, A., Hong, D.-L., Atzberger, A., Kollnberger, S., Filer, A.D., Buckley, C.D., McMichael, A., Enver, T., and Bowness, P. (2007). CD56bright human NK cells differentiate into CD56dim cells: role of contact with peripheral fibroblasts. *J. Immunol.* 179, 89–94.
- 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.
- 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.* 148, 92–98.
- Chang, J., Xia, Y., Wasserloos, K., Deng, M., Blöse, K.J., Vorp, D.A., Turnquist, H.R., Billiar, T.R., Pitt, B.A., Zhang, M.-Z., et al. (2017). Cyclic stretch induced IL-33 production through HMGB1/TLR-4 signaling pathway in murine respiratory epithelial cells. *PLoS ONE* 12, e0184770.
- Chansac, B.L.M., Moretta, A., Vergnon, I., Opolon, P., Lécluse, Y., Grunenwald, D., Kubin, M., Soria, J.-C., Chouaib, S., and Mami-Chouaib, F. (2005). NK Cells Infiltrating a MHC Class I-Deficient Lung Adenocarcinoma Display Impaired Cytotoxic Activity toward Autologous Tumor Cells Associated with Altered NK Cell-Triggering Receptors. *The Journal of Immunology* 175, 5790–5798.

- Chapman, T.L., Heikeman, A.P., and Bjorkman, P.J. (1999). The inhibitory receptor LIR-1 uses a common binding interaction to recognize class I MHC molecules and the viral homolog UL18. *Immunity* *11*, 603–613.
- Charych, D.H., Hoch, U., Langowski, J.L., Lee, S.R., Addepalli, M.K., Kirk, P.B., Sheng, D., Liu, X., Sims, P.W., VanderVeen, L.A., et al. (2016). NKTR-214, an Engineered Cytokine with Biased IL2 Receptor Binding, Increased Tumor Exposure, and Marked Efficacy in Mouse Tumor Models. *Clin. Cancer Res.* *22*, 680–690.
- Chaushu, S., Wilensky, A., Gur, C., Shapira, L., Elboim, M., Halftek, G., Polak, D., Achdout, H., Bachrach, G., and Mandelboim, O. (2012). Direct recognition of *Fusobacterium nucleatum* by the NK cell natural cytotoxicity receptor NKp46 aggravates periodontal disease. *PLoS Pathog.* *8*, e1002601.
- Chen, B., Le, W., Wang, Y., Li, Z., Wang, D., Ren, L., Lin, L., Cui, S., Hu, J.J., Hu, Y., et al. (2016a). Targeting Negative Surface Charges of Cancer Cells by Multifunctional Nanoparticles. *Theranostics* *6*, 1887–1898.
- Chen, K.H., Wada, M., Firor, A.E., Pinz, K.G., Jares, A., Liu, H., Salman, H., Golightly, M., Lan, F., Jiang, X., et al. (2016b). Novel anti-CD3 chimeric antigen receptor targeting of aggressive T cell malignancies. *Oncotarget* *7*, 56219–56232.
- Chen, K.H., Wada, M., Pinz, K.G., Liu, H., Lin, K.-W., Jares, A., Firor, A.E., Shuai, X., Salman, H., Golightly, M., et al. (2017a). Preclinical targeting of aggressive T-cell malignancies using anti-CD5 chimeric antigen receptor. *Leukemia* *31*, 2151–2160.
- Chen, S., Chen, B., Wen, Z., Huang, Z., and Ye, L. (2017b). IL-33/ST2-mediated inflammation in macrophages is directly abrogated by IL-10 during rheumatoid arthritis. *Oncotarget* *8*, 32407–32418.
- Chen, S.-F., Nieh, S., Jao, S.-W., Wu, M.-Z., Liu, C.-L., Chang, Y.-C., and Lin, Y.-S. (2013). The paracrine effect of cancer-associated fibroblast-induced interleukin-33 regulates the invasiveness of head and neck squamous cell carcinoma. *J. Pathol.* *231*, 180–189.
- Chen, W.-Y., Hong, J., Gannon, J., Kakkar, R., and Lee, R.T. (2015). Myocardial pressure overload induces systemic inflammation through endothelial cell IL-33. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *112*, 7249–7254.
- Chen, X., Han, J., Chu, J., Zhang, L., Zhang, J., Chen, C., Chen, L., Wang, Y., Wang, H., Yi, L., et al. (2016c). A combinational therapy of EGFR-CAR NK cells and oncolytic herpes simplex virus 1 for breast cancer brain metastases. *Oncotarget* *7*, 27764–27777.
- Chen, Y., Wei, H., Sun, R., Dong, Z., Zhang, J., and Tian, Z. (2007). Increased susceptibility to liver injury in hepatitis B virus transgenic mice involves NKG2D-ligand interaction and natural killer cells. *Hepatology* *46*, 706–715.
- Chen, Y.-L., Gutowska-Owsiak, D., Hardman, C.S., Westmoreland, M., MacKenzie, T., Cifuentes, L., Waithe, D., Lloyd-Lavery, A., Marquette, A., Londei, M., et al. (2019). Proof-of-concept clinical trial of etokimab shows a key role for IL-33 in atopic dermatitis pathogenesis. *Sci Transl Med* *11*.
- Cheon, E.C., Khazaie, K., Khan, M.W., Strouch, M.J., Krantz, S.B., Phillips, J., Blatner, N.R., Hix, L.M., Zhang, M., Dennis, K.L., et al. (2011). Mast cell 5-lipoxygenase activity promotes intestinal polyposis in APCDelta468 mice. *Cancer Res.* *71*, 1627–1636.
- Cherry, W.B., Yoon, J., Bartemes, K.R., Iijima, K., and Kita, H. (2008). A novel IL-1 family cytokine, IL-33, potently activates human eosinophils. *J. Allergy Clin. Immunol.* *121*, 1484–1490.
- Chertova, E., Bergamaschi, C., Chertov, O., Sowder, R., Bear, J., Roser, J.D., Beach, R.K., Lifson, J.D., Felber, B.K., and Pavlakis, G.N. (2013). Characterization and Favorable in Vivo Properties of Heterodimeric Soluble IL-15-IL-15R α Cytokine Compared to IL-15 Monomer. *J. Biol. Chem.* *288*, 18093–18103.
- Chewning, J.H., Gudme, C.N., Hsu, K.C., Selvakumar, A., and Dupont, B. (2007). KIR2DS1-positive NK cells mediate alloresponse against the C2 HLA-KIR ligand group in vitro. *J. Immunol.* *179*, 854–868.
- Chiba, S., Baghdadi, M., Akiba, H., Yoshiyama, H., Kinoshita, I., Dosaka-Akita, H., Fujioka, Y., Ohba, Y., Gorman, J.V., Colgan, J.D., et al. (2012). Tumor-infiltrating DCs suppress nucleic acid-mediated innate immune responses through interactions between the receptor TIM-3 and the alarmin HMGB1. *Nat Immunol* *13*, 832–842.
- Chinthrajah, S., Cao, S., Liu, C., Lyu, S.-C., Sindher, S.B., Long, A., Sampath, V., Petroni, D., Londei, M., and Nadeau, K.C. (2019). Phase 2a randomized, placebo-controlled study of anti-IL-33 in peanut allergy. *JCI Insight* *4*.
- 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.
- Chiyo, M., Shimozato, O., Yu, L., Kawamura, K., Iizasa, T., Fujisawa, T., and Tagawa, M. (2005). Expression of IL-27 in murine carcinoma cells produces antitumor effects and induces protective immunity in inoculated host animals. *Int. J. Cancer* *115*, 437–442.
- Cho, K.-A., Suh, J.W., Sohn, J.H., Park, J.W., Lee, H., Kang, J.L., Woo, S.-Y., and Cho, Y.J. (2012). IL-33 induces Th17-mediated airway inflammation via mast cells in ovalbumin-challenged mice. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* *302*, L429–440.

- Chockley, P.J., Chen, J., Chen, G., Beer, D.G., Standiford, T.J., and Keshamouni, V.G. (2018). Epithelial-mesenchymal transition leads to NK cell-mediated metastasis-specific immunosurveillance in lung cancer. *J Clin Invest* 128, 1384–1396.
- Choi, I., Yoon, S.R., Park, S.-Y., Kim, H., Jung, S.-J., Jang, Y.J., Kang, M., Yeom, Y.I., Lee, J.-L., Kim, D.-Y., et al. (2014). Donor-derived natural killer cells infused after human leukocyte antigen-haploidentical hematopoietic cell transplantation: a dose-escalation study. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 20, 696–704.
- Choi, Y.-S., Park, J.A., Kim, J., Rho, S.-S., Park, H., Kim, Y.-M., and Kwon, Y.-G. (2012). Nuclear IL-33 is a transcriptional regulator of NF- κ B p65 and induces endothelial cell activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 421, 305–311.
- Chong, A.S., Boussy, I.A., Jiang, X.L., Lamas, M., and Graf, L.H. (1994). CD54/ICAM-1 is a costimulator of NK cell-mediated cytotoxicity. *Cell. Immunol.* 157, 92–105.
- Chou, F.-C., Chen, H.-Y., Kuo, C.-C., and Sytwu, H.-K. (2018). Role of Galectins in Tumors and in Clinical Immunotherapy. *Int J Mol Sci* 19.
- Chow, J.Y.S., Wong, C.K., Cheung, P.F.Y., and Lam, C.W.K. (2010). Intracellular signaling mechanisms regulating the activation of human eosinophils by the novel Th2 cytokine IL-33: implications for allergic inflammation. *Cell. Mol. Immunol.* 7, 26–34.
- Chu, Y., Hochberg, J., Yahr, A., Ayello, J., Ven, C. van de, Barth, M., Czuczman, M., and Cairo, M.S. (2015). Targeting CD20+ Aggressive B-cell Non-Hodgkin Lymphoma by Anti-CD20 CAR mRNA-Modified Expanded Natural Killer Cells In Vitro and in NSG Mice. *Cancer Immunol Res* 3, 333–344.
- Chua, H.L., Serov, Y., and Brahmi, Z. (2004). Regulation of FasL expression in natural killer cells. *Hum. Immunol.* 65, 317–327.
- Chung, A.W., Navis, M., Isitman, G., Centre, R., Finlayson, R., Bloch, M., Gelgor, L., Kelleher, A., Kent, S.J., and Stratov, I. (2011). Activation of NK cells by ADCC responses during early HIV infection. *Viral Immunol.* 24, 171–175.
- Cifaldi, L., Prencipe, G., Caiello, I., Bracaglia, C., Locatelli, F., De Benedetti, F., and Strippoli, R. (2015). Inhibition of natural killer cell cytotoxicity by interleukin-6: implications for the pathogenesis of macrophage activation syndrome. *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)* 67, 3037–3046.
- Clayberger, C., and Krensky, A.M. (2003). Granulysin. *Current Opinion in Immunology* 15, 560–565.
- Clerman, A., Noor, Z., Fischelevich, R., Lockatell, V., Hampton, B.S., Shah, N.G., Salcedo, M.V., Todd, N.W., Atamas, S.P., and Luzina, I.G. (2017). The full-length interleukin-33 (FLIL33)-importin-5 interaction does not regulate nuclear localization of FLIL33 but controls its intracellular degradation. *J. Biol. Chem.* 292, 21653–21661.
- 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.
- 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.
- Cohen, E.S., Scott, I.C., Majithiya, J.B., Rapley, L., Kemp, B.P., England, E., Rees, D.G., Overed-Sayer, C.L., Woods, J., Bond, N.J., et al. (2015). Oxidation of the alarmin IL-33 regulates ST2-dependent inflammation. *Nat Commun* 6, 8327.
- Cohnen, A., Chiang, S.C., Stojanovic, A., Schmidt, H., Claus, M., Saftig, P., Janßen, O., Cerwenka, A., Bryceson, Y.T., and Watzl, C. (2013). Surface CD107a/LAMP-1 protects natural killer cells from degranulation-associated damage. *Blood* 122, 1411–1418.
- 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.
- Collins, P.L., Cella, M., Porter, S.I., Li, S., Gurewitz, G.L., Hong, H.S., Johnson, R.P., Oltz, E.M., and Colonna, M. (2019). Gene Regulatory Programs Conferring Phenotypic Identities to Human NK Cells. *Cell* 176, 348-360.e12.
- Collins, S.M., Bakan, C.E., Swartzel, G.D., Hofmeister, C.C., Efebera, Y.A., Kwon, H., Starling, G.C., Ciarlariello, D., Bhaskar, S., Briercheck, E.L., et al. (2013). Elotuzumab directly enhances NK cell cytotoxicity against myeloma via CS1 ligation: evidence for augmented NK cell function complementing ADCC. *Cancer Immunol. Immunother.* 62, 1841–1849.
- Colombo, M.P., and Trinchieri, G. (2002). Interleukin-12 in anti-tumor immunity and immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev.* 13, 155–168.
- Cone, J.C., Lu, Y., Trevillyan, J.M., Bjorndahl, J.M., and Phillips, C.A. (1993). Association of the p56lck protein tyrosine kinase with the FC γ RIIIA/CD16 complex in human natural killer cells. *European Journal of Immunology* 23, 2488–2497.
- 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.

- Cooley, S., Burns, L.J., Repka, T., and Miller, J.S. (1999). Natural killer cell cytotoxicity of breast cancer targets is enhanced by two distinct mechanisms of antibody-dependent cellular cytotoxicity against LFA-3 and HER2/neu. *Exp. Hematol.* *27*, 1533–1541.
- Cooper, M.A., Fehniger, T.A., and Caligiuri, M.A. (2001a). The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends in Immunology* *22*, 633–640.
- 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 CD56bright subset. *Blood* *97*, 3146–3151.
- Cooper, M.A., Elliott, J.M., Keyel, P.A., Yang, L., Carrero, J.A., and Yokoyama, W.M. (2009). Cytokine-induced memory-like natural killer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *106*, 1915–1919.
- Cosman, D., Müllberg, J., Sutherland, C.L., Chin, W., Armitage, R., Fanslow, W., Kubin, M., and Chalupny, N.J. (2001). ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity* *14*, 123–133.
- Coughlin, C.M., Salhany, K.E., Wysocka, M., Aruga, E., Kurzawa, H., Chang, A.E., Hunter, C.A., Fox, J.C., Trinchieri, G., and Lee, W.M. (1998). Interleukin-12 and interleukin-18 synergistically induce murine tumor regression which involves inhibition of angiogenesis. *J. Clin. Invest.* *101*, 1441–1452.
- Coyle, A.J., Lloyd, C., Tian, J., Nguyen, T., Eriksson, C., Wang, L., Ottoson, P., Persson, P., Delaney, T., Lehar, S., et al. (1999). Crucial Role of the Interleukin 1 Receptor Family Member T1/St2 in T Helper Cell Type 2–Mediated Lung Mucosal Immune Responses. *J Exp Med* *190*, 895–902.
- Crane, C.A., Han, S.J., Barry, J.J., Ahn, B.J., Lanier, L.L., and Parsa, A.T. (2010). TGF-beta downregulates the activating receptor NKG2D on NK cells and CD8+ T cells in glioma patients. *Neuro-Oncology* *12*, 7–13.
- 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.
- Crispe, I.N., Dao, T., Klugewitz, K., Mehal, W.Z., and Metz, D.P. (2000). The liver as a site of T-cell apoptosis: graveyard, or killing field? *Immunol. Rev.* *174*, 47–62.
- Crowder, R.N., and El-Deiry, W.S. (2012). Caspase-8 regulation of TRAIL-mediated cell death. *Exp. Oncol.* *34*, 160–164.
- Crozat, K., Guiton, R., Contreras, V., Feuillet, V., Dutertre, C.-A., Ventre, E., Vu Manh, T.-P., Baranek, T., Storset, A.K., Marvel, J., et al. (2010). The XC chemokine receptor 1 is a conserved selective marker of mammalian cells homologous to mouse CD8alpha+ dendritic cells. *J. Exp. Med.* *207*, 1283–1292.
- Cui, G., Qi, H., Gundersen, M.D., Yang, H., Christiansen, I., Sørbye, S.W., Goll, R., and Florholmen, J. (2015). Dynamics of the IL-33/ST2 network in the progression of human colorectal adenoma to sporadic colorectal cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* *64*, 181–190.
- Cursons, J., Souza-Fonseca-Guimaraes, 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* *7*, 1162–1174.
- Cuturi, M.C., Anegón, I., Sherman, F., Loudon, R., Clark, S.C., Perussia, B., and Trinchieri, G. (1989). Production of hematopoietic colony-stimulating factors by human natural killer cells. *The Journal of Experimental Medicine* *169*, 569–583.
- Dahl, M., Bouchelouche, P., Kramer-Marek, G., Capala, J., Nordling, J., and Bouchelouche, K. (2011). Sarcosine induces increase in HER2/neu expression in androgen-dependent prostate cancer cells. *Mol. Biol. Rep.* *38*, 4237–4243.
- Dahlberg, C.I.M., Sarhan, D., Chrobok, M., Duru, A.D., and Alici, E. (2015). Natural Killer Cell-Based Therapies Targeting Cancer: Possible Strategies to Gain and Sustain Anti-Tumor Activity. *Front Immunol* *6*, 605.
- Dale, M., and Nicklin, M.J. (1999). Interleukin-1 receptor cluster: gene organization of IL1R2, IL1R1, IL1RL2 (IL-1Rrp2), IL1RL1 (T1/ST2), and IL18R1 (IL-1Rrp) on human chromosome 2q. *Genomics* *57*, 177–179.
- Dalton, D.K., Pitts-Meek, S., Keshav, S., Figari, I.S., Bradley, A., and Stewart, T.A. (1993). Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes. *Science* *259*, 1739–1742.
- D’Andrea, A., Aste-Amezaga, M., Valiante, N.M., Ma, X., Kubin, M., and Trinchieri, G. (1993). Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J. Exp. Med.* *178*, 1041–1048.
- Davis, Z.B., Felices, M., Verneris, M.R., and Miller, J.S. (2015). Natural Killer Cell Adoptive Transfer Therapy: Exploiting the First Line of Defense Against Cancer. *Cancer J* *21*, 486–491.

- Deauvieu, F., Ollion, V., Doffin, A.-C., Achard, C., Fonteneau, J.-F., Verronese, E., Durand, I., Ghittoni, R., Marvel, J., Dezutter-Dambuyant, C., et al. (2015). Human natural killer cells promote cross-presentation of tumor cell-derived antigens by dendritic cells. *Int. J. Cancer* *136*, 1085–1094.
- Degli-Esposti, M.A., and Smyth, M.J. (2005). Close encounters of different kinds: dendritic cells and NK cells take centre stage. *Nat. Rev. Immunol.* *5*, 112–124.
- Delacher, M., Imbusch, C.D., Weichenhan, D., Breiling, A., Hotz-Wagenblatt, A., Träger, U., Hofer, A.-C., Kägebein, D., Wang, Q., Frauhammer, F., et al. (2017). Genome-wide DNA-methylation landscape defines specialization of regulatory T cells in tissues. *Nat. Immunol.* *18*, 1160–1172.
- Delacher, M., Imbusch, C.D., Hotz-Wagenblatt, A., Mallm, J.-P., Bauer, K., Simon, M., Riegel, D., Rendeiro, A.F., Bittner, S., Sanderink, L., et al. (2020). Precursors for Nonlymphoid-Tissue Treg Cells Reside in Secondary Lymphoid Organs and Are Programmed by the Transcription Factor BATF. *Immunity* *52*, 295-312.e11.
- Delahaye, N.F., Rusakiewicz, S., Martins, I., Ménard, C., Roux, S., Lyonnet, L., Paul, P., Sarabi, M., Chaput, N., Semeraro, M., et al. (2011). Alternatively spliced NKp30 isoforms affect the prognosis of gastrointestinal stromal tumors. *Nat Med* *17*, 700–707.
- 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. *Nature Immunology* *17*, 816–824.
- Della Chiesa, M., Carlomagno, S., Frumento, G., Balsamo, M., Cantoni, C., Conte, R., Moretta, L., Moretta, A., and Vitale, M. (2006). The tryptophan catabolite L-kynurenine inhibits the surface expression of NKp46- and NKG2D-activating receptors and regulates NK-cell function. *Blood* *108*, 4118–4125.
- Demyanets, S., Kaun, C., Pentz, R., Krychtiuk, K.A., Rauscher, S., Pfaffenberger, S., Zuckermann, A., Aliabadi, A., Gröger, M., Maurer, G., et al. (2013). Components of the interleukin-33/ST2 system are differentially expressed and regulated in human cardiac cells and in cells of the cardiac vasculature. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* *60*, 16–26.
- Demyanets, S., Speidl, W.S., Tentzeris, I., Jarai, R., Katsaros, K.M., Farhan, S., Krychtiuk, K.A., Wonnerth, A., Weiss, T.W., Huber, K., et al. (2014). Soluble ST2 and interleukin-33 levels in coronary artery disease: relation to disease activity and adverse outcome. *PLoS ONE* *9*, e95055.
- Deniz, G., Erten, G., Küçüksezer, U.C., Kocacik, D., Karagiannidis, C., Aktas, E., Akdis, C.A., and Akdis, M. (2008). Regulatory NK cells suppress antigen-specific T cell responses. *J. Immunol.* *180*, 850–857.
- Denkert, C., Minckwitz, G. von, Darb-Esfahani, S., Lederer, B., Heppner, B.I., Weber, K.E., Budczies, J., Huober, J., Klauschen, F., Furlanetto, J., et al. (2018). Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. *The Lancet Oncology* *19*, 40–50.
- Denman, C.J., Senyukov, V.V., Somanchi, S.S., Phatarpekar, P.V., Kopp, L.M., Johnson, J.L., Singh, H., Hurton, L., Maiti, S.N., Huls, M.H., et al. (2012). Membrane-bound IL-21 promotes sustained ex vivo proliferation of human natural killer cells. *PLoS ONE* *7*, e30264.
- Diefenbach, A., Jamieson, A.M., Liu, S.D., Shastri, N., and Raulet, D.H. (2000). Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages. *Nat. Immunol.* *1*, 119–126.
- Diefenbach, A., Hsia, J.K., Hsiung, M.-Y.B., and Raulet, D.H. (2003). A novel ligand for the NKG2D receptor activates NK cells and macrophages and induces tumor immunity. *Eur. J. Immunol.* *33*, 381–391.
- Dieu-Nosjean, M.-C., Giraldo, N.A., Kaplon, H., Germain, C., Fridman, W.H., and Sautès-Fridman, C. (2016). Tertiary lymphoid structures, drivers of the anti-tumor responses in human cancers. *Immunological Reviews* *271*, 260–275.
- Dimberg, L.Y., Anderson, C.K., Camidge, R., Behbakht, K., Thorburn, A., and Ford, H.L. (2013). On the TRAIL to successful cancer therapy? Predicting and counteracting resistance against TRAIL-based therapeutics. *Oncogene* *32*, 1341–1350.
- Dimopoulos, M., Spencer, A., Attal, M., Prince, H.M., Harousseau, J.-L., Dmoszynska, A., Miguel, J.S., Hellmann, A., Facon, T., Foà, R., et al. (2007). Lenalidomide plus Dexamethasone for Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *New England Journal of Medicine* *357*, 2123–2132.
- Dogra, P., Rancan, C., Ma, W., Toth, M., Senda, T., Carpenter, D.J., Kubota, M., Matsumoto, R., Thapa, P., Szabo, P.A., et al. (2020). Tissue Determinants of Human NK Cell Development, Function, and Residence. *Cell* *180*, 749-763.e13.
- 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.
- Dong, W., Wu, X., Ma, S., Wang, Y., Nalin, A.P., Zhu, Z., Zhang, J., Benson, D.M., He, K., Caligiuri, M.A., et al. (2019). The Mechanism of Anti-PD-L1 Antibody Efficacy against PD-L1-Negative Tumors Identifies NK Cells Expressing PD-L1 as a Cytolytic Effector. *Cancer Discov* *9*, 1422–1437.
- Dorner, B.G., Scheffold, A., Rolph, M.S., Hüser, M.B., Kaufmann, S.H.E., Radbruch, A., Flesch, I.E.A., and Kroczeck, R.A. (2002). MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, and ATAC/lymphotactin function together with IFN- γ as type 1 cytokines. *PNAS* *99*, 6181–6186.

- Douagi, I., Colucci, F., Di Santo, J.P., and Cumano, A. (2002). Identification of the earliest prethymic bipotent T/NK progenitor in murine fetal liver. *Blood* *99*, 463–471.
- Dreis, C., Ottenlinger, F.M., Putyrski, M., Ernst, A., Huhn, M., Schmidt, K.G., Pfeilschifter, J.M., and Radeke, H.H. (2019). Tissue Cytokine IL-33 Modulates the Cytotoxic CD8 T Lymphocyte Activity During Nutrient Deprivation by Regulation of Lineage-Specific Differentiation Programs. *Front. Immunol.* *10*.
- Duan, L., Chen, J., Zhang, H., Yang, H., Zhu, P., Xiong, A., Xia, Q., Zheng, F., Tan, Z., Gong, F., et al. (2012). Interleukin-33 Ameliorates Experimental Colitis through Promoting Th2/Foxp3 + Regulatory T-Cell Responses in Mice. *Mol Med* *18*, 753–761.
- Dubois, S., Mariner, J., Waldmann, T.A., and Tagaya, Y. (2002). IL-15 α recycles and presents IL-15 In trans to neighboring cells. *Immunity* *17*, 537–547.
- 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.
- Duterte, C.-A., Bonnin-Gélizé, E., Pulford, K., Bourel, D., Fridman, W.-H., and Teillaud, J.-L. (2008). A novel subset of NK cells expressing high levels of inhibitory Fc γ RIIB modulating antibody-dependent function. *Journal of Leukocyte Biology* *84*, 1511–1520.
- Dybkaer, K., Iqbal, J., Zhou, G., Geng, H., Xiao, L., Schmitz, A., d'Amore, F., and Chan, W.C. (2007). Genome wide transcriptional analysis of resting and IL2 activated human natural killer cells: gene expression signatures indicative of novel molecular signaling pathways. *BMC Genomics* *8*, 230.
- Ebert, L.M., Meuter, S., and Moser, B. (2006). Homing and function of human skin gammadelta T cells and NK cells: relevance for tumor surveillance. *J. Immunol.* *176*, 4331–4336.
- 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.* *90*, 55–66.
- Eggert, A., Grotzer, M.A., Zuzak, T.J., Wiewrodt, B.R., Ho, R., Ikegaki, N., and Brodeur, G.M. (2001). Resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in neuroblastoma cells correlates with a loss of caspase-8 expression. *Cancer Res.* *61*, 1314–1319.
- Eguizabal, C., Zenarruzabeitia, O., Monge, J., Santos, S., Vesga, M.A., Maruri, N., Arrieta, A., Riñón, M., Tamayo-Orbegozo, E., Amo, L., et al. (2014). Natural killer cells for cancer immunotherapy: pluripotent stem cells-derived NK cells as an immunotherapeutic perspective. *Front Immunol* *5*, 439.
- Eischen, C.M., Schilling, J.D., Lynch, D.H., Krammer, P.H., and Leibson, P.J. (1996). Fc receptor-induced expression of Fas ligand on activated NK cells facilitates cell-mediated cytotoxicity and subsequent autocrine NK cell apoptosis. *J. Immunol.* *156*, 2693–2699.
- Eissmann, M.F., Dijkstra, C., Jarnicki, A., Pheese, T., Brunberg, J., Poh, A.R., Etemadi, N., Tsantikos, E., Thiem, S., Huntington, N.D., et al. (2019). IL-33-mediated mast cell activation promotes gastric cancer through macrophage mobilization. *Nature Communications* *10*, 1–16.
- Eissmann, P., Beauchamp, L., Wooters, J., Tilton, J.C., Long, E.O., and Watzl, C. (2005). Molecular basis for positive and negative signaling by the natural killer cell receptor 2B4 (CD244). *Blood* *105*, 4722–4729.
- Elias, S., Yamin, R., Golomb, L., Tsukerman, P., Stanietzky-Kaynan, N., Ben-Yehuda, D., and Mandelboim, O. (2014). Immune evasion by oncogenic proteins of acute myeloid leukemia. *Blood* *123*, 1535–1543.
- Elliott, J.M., and Yokoyama, W.M. (2011). Unifying concepts of MHC-dependent natural killer cell education. *Trends Immunol.* *32*, 364–372.
- Enoksson, M., Lyberg, K., Möller-Westerberg, C., Fallon, P.G., Nilsson, G., and Lunderius-Andersson, C. (2011). Mast Cells as Sensors of Cell Injury through IL-33 Recognition. *The Journal of Immunology* *186*, 2523–2528.
- Espinassous, Q., Garcia-de-Paco, E., Garcia-Verdugo, I., Synguelakis, M., von Aulock, S., Sallenave, J.-M., McKenzie, A.N.J., and Kanellopoulos, J. (2009). IL-33 enhances lipopolysaccharide-induced inflammatory cytokine production from mouse macrophages by regulating lipopolysaccharide receptor complex. *J. Immunol.* *183*, 1446–1455.
- Esplugues, E., Sancho, D., Vega-Ramos, J., Martínez, C., Syrbe, U., Hamann, A., Engel, P., Sánchez-Madrid, F., and Lauzurica, P. (2003). Enhanced antitumor immunity in mice deficient in CD69. *J. Exp. Med.* *197*, 1093–1106.
- Everts, B., Tussiwand, R., Dreesen, L., Fairfax, K.C., Huang, S.C.-C., Smith, A.M., O'Neill, C.M., Lam, W.Y., Edelson, B.T., Urban, J.F., et al. (2016). Migratory CD103+ dendritic cells suppress helminth-driven type 2 immunity through constitutive expression of IL-12. *J. Exp. Med.* *213*, 35–51.
- Fahey, T.J., Tracey, K.J., Tekamp-Olson, P., Cousens, L.S., Jones, W.G., Shires, G.T., Cerami, A., and Sherry, B. (1992). Macrophage inflammatory protein 1 modulates macrophage function. *J. Immunol.* *148*, 2764–2769.

- Fang, M., Li, Y., Huang, K., Qi, S., Zhang, J., Zgodzinski, W., Majewski, M., Wallner, G., Gozdz, S., Macek, P., et al. (2017a). IL33 Promotes Colon Cancer Cell Stemness via JNK Activation and Macrophage Recruitment. *Cancer Res.* *77*, 2735–2745.
- Fang, Y., Zhao, L., Xiao, H., Cook, K.M., Bai, Q., Herrick, E.J., Chen, X., Qin, C., Zhu, Z., Wakefield, M.R., et al. (2017b). IL-33 acts as a foe to MIA PaCa-2 pancreatic cancer. *Med. Oncol.* *34*, 23.
- Fauriat, C., Long, E.O., Ljunggren, H.-G., and Bryceson, Y.T. (2010). Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood* *115*, 2167–2176.
- Fehniger, T.A., Shah, M.H., Turner, M.J., VanDeusen, J.B., Whitman, S.P., Cooper, M.A., Suzuki, K., Wechsler, M., Goodsaid, F., and Caligiuri, M.A. (1999). Differential cytokine and chemokine gene expression by human NK cells following activation with IL-18 or IL-15 in combination with IL-12: implications for the innate immune response. *J. Immunol.* *162*, 4511–4520.
- Fehniger, T.A., Suzuki, K., VanDeusen, J.B., Cooper, M.A., Freud, A.G., and Caligiuri, M.A. (2001). Fatal leukemia in interleukin-15 transgenic mice. *Blood Cells Mol. Dis.* *27*, 223–230.
- Fehniger, T.A., Cooper, M.A., Nuovo, G.J., Cella, M., Facchetti, F., Colonna, M., and Caligiuri, M.A. (2003). CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood* *101*, 3052–3057.
- Fehniger, T.A., Cai, S.F., Cao, X., Bredemeyer, A.J., Presti, R.M., French, A.R., and Ley, T.J. (2007). Acquisition of murine NK cell cytotoxicity requires the translation of a pre-existing pool of granzyme B and perforin mRNAs. *Immunity* *26*, 798–811.
- Felices, M., Lenvik, A., Chu, S., McElmurry, R., Cooley, S., Tolar, J., Blazar, B.R., and Miller, J.S. (2016). Continuous IL-15 Signaling Leads to Functional Exhaustion of Human Natural Killer Cells through Metabolic Changes That Alters Their In Vivo Anti-Tumor Activity. *Blood* *128*, 551–551.
- 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*.
- Ferlazzo, G., and Moretta, L. (2014). Dendritic cell editing by natural killer cells. *Crit Rev Oncog* *19*, 67–75.
- Ferlazzo, G., Pack, M., Thomas, D., Paludan, C., Schmid, D., Strowig, T., Bougras, G., Muller, W.A., Moretta, L., and Münz, C. (2004). Distinct roles of IL-12 and IL-15 in human natural killer cell activation by dendritic cells from secondary lymphoid organs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *101*, 16606–16611.
- Ferrari de Andrade, L., Tay, R.E., Pan, D., Luoma, A.M., Ito, Y., Badrinath, S., Tsoucas, D., Franz, B., May, K.F., Harvey, C.J., et al. (2018). Antibody-mediated inhibition of MICA and MICB shedding promotes NK cell-driven tumor immunity. *Science* *359*, 1537–1542.
- Feuerer, M., Herrero, L., Cipolletta, D., Naaz, A., Wong, J., Nayer, A., Lee, J., Goldfine, A.B., Benoist, C., Shoelson, S., et al. (2009). Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nature Medicine* *15*, 930–939.
- Fischer, J.C., Ottinger, H., Ferencik, S., Sribar, M., Punzel, M., Beelen, D.W., Schwan, M.A., Grosse-Wilde, H., Wernet, P., and Uhrberg, M. (2007). Relevance of C1 and C2 epitopes for hemopoietic stem cell transplantation: role for sequential acquisition of HLA-C-specific inhibitory killer Ig-like receptor. *J. Immunol.* *178*, 3918–3923.
- Flamar, A.-L., Klose, C.S.N., Moeller, J.B., Mahlaköiv, T., Bessman, N.J., Zhang, W., Moriyama, S., Stokic-Trtica, V., Rankin, L.C., Putzel, G.G., et al. (2020). Interleukin-33 Induces the Enzyme Tryptophan Hydroxylase 1 to Promote Inflammatory Group 2 Innate Lymphoid Cell-Mediated Immunity. *Immunity* *52*, 606-619.e6.
- Flavell, R.A., Sanjabi, S., Wrzesinski, S.H., and Licona-Limón, P. (2010). The polarization of immune cells in the tumour environment by TGFβ. *Nature Reviews Immunology* *10*, 554–567.
- Flodström, M., Maday, A., Balakrishna, D., Cleary, M.M., Yoshimura, A., and Sarvetnick, N. (2002). Target cell defense prevents the development of diabetes after viral infection. *Nat. Immunol.* *3*, 373–382.
- Fock, V., Mairhofer, M., Otti, G.R., Hiden, U., Spittler, A., Zeisler, H., Fiala, C., Knöfler, M., and Pollheimer, J. (2013). Macrophage-derived IL-33 is a critical factor for placental growth. *J. Immunol.* *191*, 3734–3743.
- Foley, B., Cooley, S., Verneris, M.R., Pitt, M., Curtsinger, J., Luo, X., Lopez-Vergès, S., Lanier, L.L., Weisdorf, D., and Miller, J.S. (2012). Cytomegalovirus reactivation after allogeneic transplantation promotes a lasting increase in educated NKG2C+ natural killer cells with potent function. *Blood* *119*, 2665–2674.
- Freud, A.G., Becknell, B., Roychowdhury, S., Mao, H.C., Ferketich, A.K., Nuovo, G.J., Hughes, T.L., Marburger, T.B., Sung, J., Baiocchi, R.A., et al. (2005). A human CD34(+) subset resides in lymph nodes and differentiates into CD56bright natural killer cells. *Immunity* *22*, 295–304.

- Freud, A.G., Yokohama, A., Becknell, B., Lee, M.T., Mao, H.C., Ferketich, A.K., and Caligiuri, M.A. (2006). Evidence for discrete stages of human natural killer cell differentiation in vivo. *J. Exp. Med.* *203*, 1033–1043.
- Freud, A.G., Yu, J., and Caligiuri, M.A. (2014). Human natural killer cell development in secondary lymphoid tissues. *Semin. Immunol.* *26*, 132–137.
- Freud, A.G., Mundy-Bosse, B.L., Yu, J., and Caligiuri, M.A. (2017). The Broad Spectrum of Human Natural Killer Cell Diversity. *Immunity* *47*, 820–833.
- Fridman, W.H. (1987). Le point sur le traitement des cancers par l'association LAK/interleukine 2. *M/S. Médecine sciences [revue papier, ISSN : 0767-0974]*, 1987, Vol. 3, N° 8; p.490-491.
- Frisbee, A.L., Saleh, M.M., Young, M.K., Leslie, J.L., Simpson, M.E., Abhyankar, M.M., Cowardin, C.A., Ma, J.Z., Pramoongjago, P., Turner, S.D., et al. (2019). IL-33 drives group 2 innate lymphoid cell-mediated protection during *Clostridium difficile* infection. *Nature Communications* *10*, 1–13.
- Fu, J., Lin, S., Wang, C., Li, S., Feng, X., Liu, Q., and Xu, F. (2016). HMGB1 regulates IL-33 expression in acute respiratory distress syndrome. *International Immunopharmacology* *38*, 267–274.
- Fu, X., Liu, Y., Li, L., Li, Q., Qiao, D., Wang, H., Lao, S., Fan, Y., and Wu, C. (2011). Human natural killer cells expressing the memory-associated marker CD45RO from tuberculous pleurisy respond more strongly and rapidly than CD45RO- natural killer cells following stimulation with interleukin-12. *Immunology* *134*, 41–49.
- Fulda, S., Küfer, M.U., Meyer, E., van Valen, F., Dockhorn-Dworniczak, B., and Debatin, K.M. (2001). Sensitization for death receptor- or drug-induced apoptosis by re-expression of caspase-8 through demethylation or gene transfer. *Oncogene* *20*, 5865–5877.
- Furukawa, S., Moriyama, M., Miyake, K., Nakashima, H., Tanaka, A., Maehara, T., Iizuka-Koga, M., Tsuboi, H., Hayashida, J.-N., Ishiguro, N., et al. (2017). Interleukin-33 produced by M2 macrophages and other immune cells contributes to Th2 immune reaction of IgG4-related disease. *Sci Rep* *7*, 42413.
- Gadani, S.P., Walsh, J.T., Smirnov, I., Zheng, J., and Kipnis, J. (2015). The glia-derived alarmin IL-33 orchestrates the immune response and promotes recovery following CNS injury. *Neuron* *85*, 703–709.
- Gallois, A., Silva, I., Osman, I., and Bhardwaj, N. (2014). Reversal of natural killer cell exhaustion by TIM-3 blockade. *Oncoimmunology* *3*, e946365.
- Gantke, T., Weichel, M., Herbrecht, C., Reusch, U., Ellwanger, K., Fucek, I., Eser, M., Müller, T., Griep, R., Molkenthin, V., et al. (2017). Trispecific antibodies for CD16A-directed NK cell engagement and dual-targeting of tumor cells. *Protein Eng. Des. Sel.* *30*, 673–684.
- Gao, K., Li, X., Zhang, L., Bai, L., Dong, W., Gao, K., Shi, G., Xia, X., Wu, L., and Zhang, L. (2013). Transgenic expression of IL-33 activates CD8(+) T cells and NK cells and inhibits tumor growth and metastasis in mice. *Cancer Lett.* *335*, 463–471.
- Gao, S., Huan, S.-L., Han, L.-Y., Li, F., Ji, X.-F., Li, X.-Y., Fan, Y.-C., and Wang, K. (2015a). Overexpression of serum sST2 is associated with poor prognosis in acute-on-chronic hepatitis B liver failure. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology* *39*, 315–323.
- Gao, X., Wang, X., Yang, Q., Zhao, X., Wen, W., Li, G., Lu, J., Qin, W., Qi, Y., Xie, F., et al. (2015b). Tumoral expression of IL-33 inhibits tumor growth and modifies the tumor microenvironment through CD8+ T and NK cells. *J. Immunol.* *194*, 438–445.
- 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.
- Garcia-Iglesias, T., Del Toro-Arreola, A., Albarran-Somoza, B., Del Toro-Arreola, S., Sanchez-Hernandez, P.E., Ramirez-Dueñas, M.G., Balderas-Peña, L.M.A., Bravo-Cuellar, A., Ortiz-Lazareno, P.C., and Daneri-Navarro, A. (2009). Low NKp30, NKp46 and NKG2D expression and reduced cytotoxic activity on NK cells in cervical cancer and precursor lesions. *BMC Cancer* *9*, 186.
- Garlanda, C., Dinarello, C.A., and Mantovani, A. (2013). The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity* *39*, 1003–1018.
- Gasser, S., Orsulic, S., Brown, E.J., and Raulet, D.H. (2005). The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature* *436*, 1186–1190.
- Gasteiger, G., Hemmers, S., Firth, M.A., Le Floc'h, A., Huse, M., Sun, J.C., and Rudensky, A.Y. (2013). IL-2-dependent tuning of NK cell sensitivity for target cells is controlled by regulatory T cells. *J. Exp. Med.* *210*, 1167–1178.
- 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.

- Gautier, V., Cayrol, C., Farache, D., Roga, S., Monsarrat, B., Bulet-Schiltz, O., Gonzalez de Peredo, A., and Girard, J.-P. (2016). Extracellular IL-33 cytokine, but not endogenous nuclear IL-33, regulates protein expression in endothelial cells. *Sci Rep* 6, 34255.
- Geller, M.A., Cooley, S., Judson, P.L., Ghebre, R., Carson, L.F., Argenta, P.A., Jonson, A.L., Panoskaltsis-Mortari, A., Curtsinger, J., McKenna, D., et al. (2011). A phase II study of allogeneic natural killer cell therapy to treat patients with recurrent ovarian and breast cancer. *Cytotherapy* 13, 98–107.
- 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.
- 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.
- Gillibert-Duplantier, J., Duthey, B., Sisirak, V., Salaün, D., Gargi, T., Trédan, O., Finetti, P., Bertucci, F., Birnbaum, D., Bendriss-Vermare, N., et al. (2012). Gene expression profiling identifies sST2 as an effector of ErbB2-driven breast carcinoma cell motility, associated with metastasis. *Oncogene* 31, 3516–3524.
- Gimeno Brias, S., Marsden, M., Forbester, J., Clement, M., Brandt, C., Harcourt, K., Kane, L., Chapman, L., Clare, S., and Humphreys, I.R. (2018). Interferon lambda is required for interferon gamma-expressing NK cell responses but does not afford antiviral protection during acute and persistent murine cytomegalovirus infection. *PLoS ONE* 13, e0197596.
- Girart, M.V., Fuertes, M.B., Domaica, C.I., Rossi, L.E., and Zwirner, N.W. (2007). Engagement of TLR3, TLR7, and NKG2D Regulate IFN- γ Secretion but Not NKG2D-Mediated Cytotoxicity by Human NK Cells Stimulated with Suboptimal Doses of IL-12. *The Journal of Immunology* 179, 3472–3479.
- 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.* 188, 2509–2515.
- 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- γ Production by Natural Killer Cells Increases Fibronectin 1 to Alter Tumor Architecture and Control Metastasis. *Immunity* 48, 107-119.e4.
- Gleason, M.K., Verneris, M.R., Todhunter, D.A., Zhang, B., McCullar, V., Zhou, S.X., Panoskaltsis-Mortari, A., Weiner, L.M., Vallera, D.A., and Miller, J.S. (2012). Bispecific and trispecific killer cell engagers directly activate human NK cells through CD16 signaling and induce cytotoxicity and cytokine production. *Mol. Cancer Ther.* 11, 2674–2684.
- Gleason, M.K., Ross, J.A., Warlick, E.D., Lund, T.C., Verneris, M.R., Wiernik, A., Spellman, S., Haagenson, M.D., Lenvik, A.J., Litzow, M.R., et al. (2014). CD16xCD33 bispecific killer cell engager (BiKE) activates NK cells against primary MDS and MDSC CD33+ targets. *Blood* 123, 3016–3026.
- Glienke, W., Esser, R., Priesner, C., Suerth, J.D., Schambach, A., Wels, W.S., Grez, M., Kloess, S., Arseniev, L., and Koehl, U. (2015). Advantages and applications of CAR-expressing natural killer cells. *Front Pharmacol* 6, 21.
- Gordon, E.D., Simpson, L.J., Rios, C.L., Ringel, L., Lachowicz-Scroggins, M.E., Peters, M.C., Wesolowska-Andersen, A., Gonzalez, J.R., MacLeod, H.J., Christian, L.S., et al. (2016). Alternative splicing of interleukin-33 and type 2 inflammation in asthma. *PNAS* 113, 8765–8770.
- Gorelik, E., Wiltrot, R.H., Okumura, K., Habu, S., and Herberman, R.B. (1982). Role of NK cells in the control of metastatic spread and growth of tumor cells in mice. *International Journal of Cancer* 30, 107–112.
- Gounaris, E., Erdman, S.E., Restaino, C., Gurish, M.F., Friend, D.S., Gounari, F., Lee, D.M., Zhang, G., Glickman, J.N., Shin, K., et al. (2007). Mast cells are an essential hematopoietic component for polyp development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 19977–19982.
- Goy, A., Sinha, R., Williams, M.E., Kalayoglu Besisik, S., Drach, J., Ramchandren, R., Zhang, L., Cicero, S., Fu, T., and Witzig, T.E. (2013). Single-agent lenalidomide in patients with mantle-cell lymphoma who relapsed or progressed after or were refractory to bortezomib: phase II MCL-001 (EMERGE) study. *J. Clin. Oncol.* 31, 3688–3695.
- Gramatzki, D., Frei, K., Cathomas, G., Moch, H., Weller, M., and Mertz, K.D. (2016). Interleukin-33 in human gliomas: Expression and prognostic significance. *Oncol Lett* 12, 445–452.
- Granucci, F., Zanoni, I., Pavelka, N., Van Dommelen, S.L.H., Andoniou, C.E., Belardelli, F., Degli Esposti, M.A., and Ricciardi-Castagnoli, P. (2004). A contribution of mouse dendritic cell-derived IL-2 for NK cell activation. *J. Exp. Med.* 200, 287–295.
- Granzin, M., Stojanovic, A., Miller, M., Childs, R., Huppert, V., and Cerwenka, A. (2016). Highly efficient IL-21 and feeder cell-driven ex vivo expansion of human NK cells with therapeutic activity in a xenograft mouse model of melanoma. *Oncimmunology* 5, e1219007.
- Granzin, M., Wagner, J., Köhl, U., Cerwenka, A., Huppert, V., and Ullrich, E. (2017). Shaping of Natural Killer Cell Antitumor Activity by Ex Vivo Cultivation. *Front Immunol* 8.

- Gray, J.D., Hirokawa, M., Ohtsuka, K., and Horwitz, D.A. (1998). Generation of an Inhibitory Circuit Involving CD8+ T Cells, IL-2, and NK Cell-Derived TGF- β : Contrasting Effects of Anti-CD2 and Anti-CD3. *The Journal of Immunology* *160*, 2248–2254.
- 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.
- Grivennikov, S., Karin, E., Terzic, J., Mucida, D., Yu, G.-Y., Vallabhapurapu, S., Scheller, J., Rose-John, S., Cheroutre, H., Eckmann, L., et al. (2009). IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell* *15*, 103–113.
- Groh, V., Rhinehart, R., Secrist, H., Bauer, S., Grabstein, K.H., and Spies, T. (1999). Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *96*, 6879–6884.
- Groh, V., Rhinehart, R., Randolph-Habecker, J., Topp, M.S., Riddell, S.R., and Spies, T. (2001). Costimulation of CD8 α beta T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat. Immunol.* *2*, 255–260.
- Grotenboer, N.S., Ketelaar, M.E., Koppelman, G.H., and Nawijn, M.C. (2013). Decoding asthma: translating genetic variation in IL33 and IL1RL1 into disease pathophysiology. *J. Allergy Clin. Immunol.* *131*, 856–865.
- Guerra, N., Tan, Y.X., Joncker, N.T., Choy, A., Gallardo, F., Xiong, N., Knoblaugh, S., Cado, D., Greenberg, N.R., and Raulet, D.H. (2008). NKG2D-Deficient Mice Are Defective in Tumor Surveillance in Models of Spontaneous Malignancy. *Immunity* *28*, 571–580.
- Guicciardi, M.E., and Gores, G.J. (2009). Life and death by death receptors. *FASEB J* *23*, 1625–1637.
- Guillerey, C., Chow, M.T., Miles, K., Olver, S., Sceneay, J., Takeda, K., Möller, A., and Smyth, M.J. (2015a). Toll-like receptor 3 regulates NK cell responses to cytokines and controls experimental metastasis. *Oncoimmunology* *4*.
- Guillerey, C., Ferrari de Andrade, L., Vuckovic, S., Miles, K., Ngiow, S.F., Yong, M.C.R., Teng, M.W.L., Colonna, M., Ritchie, D.S., Chesi, M., et al. (2015b). Immunosurveillance and therapy of multiple myeloma are CD226 dependent. *J. Clin. Invest.* *125*, 2077–2089.
- Gutbrodt, K.L., Schliemann, C., Giovannoni, L., Frey, K., Pabst, T., Klapper, W., Berdel, W.E., and Neri, D. (2013). Antibody-based delivery of interleukin-2 to neovasculature has potent activity against acute myeloid leukemia. *Sci Transl Med* *5*, 201ra118.
- Habermann, T.M., Lossos, I.S., Justice, G., Vose, J.M., Wiernik, P.H., McBride, K., Wride, K., Ervin-Haynes, A., Takeshita, K., Pietronigro, D., et al. (2009). Lenalidomide oral monotherapy produces a high response rate in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma. *Br. J. Haematol.* *145*, 344–349.
- Hacker, S., Lambers, C., Pollreis, A., Hoetzenecker, K., Lichtenauer, M., Mangold, A., Niederpold, T., Hacker, A., Lang, G., Dworschak, M., et al. (2009). Increased soluble serum markers caspase-cleaved cytokeratin-18, histones, and ST2 indicate apoptotic turnover and chronic immune response in COPD. *J. Clin. Lab. Anal.* *23*, 372–379.
- Haeblerlein, S., Sebald, H., Bogdan, C., and Schleicher, U. (2010). IL-18, but not IL-15, contributes to the IL-12-dependent induction of NK-cell effector functions by *Leishmania infantum* in vivo. *Eur. J. Immunol.* *40*, 1708–1717.
- Haenuli, Y., Matsushita, K., Futatsugi-Yumikura, S., Ishii, K.J., Kawagoe, T., Imoto, Y., Fujieda, S., Yasuda, M., Hisa, Y., Akira, S., et al. (2012). A critical role of IL-33 in experimental allergic rhinitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* *130*, 184-194.e11.
- Hagner, P.R., Chiu, H., Ortiz, M., Apollonio, B., Wang, M., Couto, S., Waldman, M.F., Flynt, E., Ramsay, A.G., Trotter, M., et al. (2017). Activity of lenalidomide in mantle cell lymphoma can be explained by NK cell-mediated cytotoxicity. *Br. J. Haematol.* *179*, 399–409.
- Halama, N., Braun, M., Kahlert, C., Spille, A., Quack, C., Rahbari, N., Koch, M., Weitz, J., Kloor, M., Zoernig, I., et al. (2011). Natural killer cells are scarce in colorectal carcinoma tissue despite high levels of chemokines and cytokines. *Clin. Cancer Res.* *17*, 678–689.
- Halftack, 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.* *182*, 2221–2230.
- Hamann, I., Unterwalder, N., Cardona, A.E., Meisel, C., Zipp, F., Ransohoff, R.M., and Infante-Duarte, C. (2011). Analyses of phenotypic and functional characteristics of CX3CR1-expressing natural killer cells. *Immunology* *133*, 62–73.
- Hamawy, M.M., Mergenhagen, S.E., and Siraganian, R.P. (1994). Adhesion molecules as regulators of mast-cell and basophil function. *Immunol. Today* *15*, 62–66.
- Hammer, Q., and Romagnani, C. (2017). About Training and Memory: NK-Cell Adaptation to Viral Infections. *Adv. Immunol.* *133*, 171–207.
- Hammer, Q., Rückert, T., Borst, E.M., Dunst, J., Haubner, A., Durek, P., Heinrich, F., Gasparoni, G., Babic, M., Tomic, A., et al. (2018). Peptide-specific recognition of human cytomegalovirus strains controls adaptive natural killer cells. *Nature Immunology* *19*, 453–463.

- Hanna, J., Bechtel, P., Zhai, Y., Youssef, F., McLachlan, K., and Mandelboim, O. (2004). Novel insights on human NK cells' immunological modalities revealed by gene expression profiling. *J. Immunol.* *173*, 6547–6563.
- Hanna, J., Goldman-Wohl, D., Hamani, Y., Avraham, I., Greenfield, C., Natanson-Yaron, S., Prus, D., Cohen-Daniel, L., Arnon, T.I., Manaster, I., et al. (2006). Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nature Medicine* *12*, 1065–1074.
- Harada, H., Watanabe, S., Saijo, K., Ishiwata, I., and Ohno, T. (2004). A Wilms tumor cell line, HFWT, can greatly stimulate proliferation of CD56+ human natural killer cells and their novel precursors in blood mononuclear cells. *Exp. Hematol.* *32*, 614–621.
- Hardman, C.S., Panova, V., and McKenzie, A.N.J. (2013). IL-33 citrine reporter mice reveal the temporal and spatial expression of IL-33 during allergic lung inflammation. *Eur. J. Immunol.* *43*, 488–498.
- Hart, O.M., Athie-Morales, V., O'Connor, G.M., and Gardiner, C.M. (2005). TLR7/8-mediated activation of human NK cells results in accessory cell-dependent IFN-gamma production. *J. Immunol.* *175*, 1636–1642.
- Hashimoto, W., Osaki, T., Okamura, H., Robbins, P.D., Kurimoto, M., Nagata, S., Lotze, M.T., and Tahara, H. (1999). Differential antitumor effects of administration of recombinant IL-18 or recombinant IL-12 are mediated primarily by Fas-Fas ligand- and perforin-induced tumor apoptosis, respectively. *J. Immunol.* *163*, 583–589.
- Hatzioannou, A., Banos, A., Sakelariopoulos, T., Fedonidis, C., Vidali, M.-S., Köhne, M., Händler, K., Boon, L., Henriques, A., Koliarakis, V., et al. (2020). An intrinsic role of IL-33 in Treg cell-mediated tumor immunoevasion. *Nat. Immunol.* *21*, 75–85.
- Hayakawa, H., Hayakawa, M., Kume, A., and Tominaga, S. (2007). Soluble ST2 blocks interleukin-33 signaling in allergic airway inflammation. *J. Biol. Chem.* *282*, 26369–26380.
- Hayakawa, M., Hayakawa, H., Matsuyama, Y., Tamemoto, H., Okazaki, H., and Tominaga, S. (2009). Mature interleukin-33 is produced by calpain-mediated cleavage in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *387*, 218–222.
- Hayakawa, Y., Screpanti, V., Yagita, H., Grandien, A., Ljunggren, H.-G., Smyth, M.J., and Chambers, B.J. (2004). NK cell TRAIL eliminates immature dendritic cells in vivo and limits dendritic cell vaccination efficacy. *J. Immunol.* *172*, 123–129.
- Hayakawa, Y., Huntington, N.D., Nutt, S.L., and Smyth, M.J. (2006). Functional subsets of mouse natural killer cells. *Immunol. Rev.* *214*, 47–55.
- Hejazi, M., Manser, A.R., Fröbel, J., Kündgen, A., Zhao, X., Schönberg, K., Germing, U., Haas, R., Gattermann, N., and Uhrberg, M. (2015). Impaired cytotoxicity associated with defective natural killer cell differentiation in myelodysplastic syndromes. *Haematologica* *100*, 643–652.
- Hepworth, M.R., Daniłowicz-Luebert, E., Rausch, S., Metz, M., Klotz, C., Maurer, M., and Hartmann, S. (2012). Mast cells orchestrate type 2 immunity to helminths through regulation of tissue-derived cytokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *109*, 6644–6649.
- Hercend, T., Farace, F., Baume, D., Charpentier, F., Droz, J.P., Triebel, F., and Escudier, B. (1990). Immunotherapy with lymphokine-activated natural killer cells and recombinant interleukin-2: a feasibility trial in metastatic renal cell carcinoma. *J Biol Response Mod* *9*, 546–555.
- Hernández-Caselles, T., Martínez-Esparza, M., Pérez-Oliva, A.B., Quintanilla-Cecconi, A.M., García-Alonso, A., Alvarez-López, D.M.R., and García-Peñarrubia, P. (2006). A study of CD33 (SIGLEC-3) antigen expression and function on activated human T and NK cells: two isoforms of CD33 are generated by alternative splicing. *J. Leukoc. Biol.* *79*, 46–58.
- Hersey, P., Edwards, A., Honeyman, M., and McCarthy, W.H. (1979). Low natural-killer-cell activity in familial melanoma patients and their relatives. *Br J Cancer* *40*, 113–122.
- Hibbert, L., Pflanz, S., De Waal Malefyt, R., and Kastelein, R.A. (2003). IL-27 and IFN-alpha signal via Stat1 and Stat3 and induce T-Bet and IL-12Rbeta2 in naive T cells. *J. Interferon Cytokine Res.* *23*, 513–522.
- Hinz, S., Trauzold, A., Boenicke, L., Sandberg, C., Beckmann, S., Bayer, E., Walczak, H., Kalthoff, H., and Ungefroren, H. (2000). Bcl-XL protects pancreatic adenocarcinoma cells against CD95- and TRAIL-receptor-mediated apoptosis. *Oncogene* *19*, 5477–5486.
- Hiraide, S., Yanagawa, Y., and Iizuka, K. (2018). Tranilast inhibits interleukin-33 production by macrophages. *Eur. J. Pharmacol.* *818*, 235–240.
- Hirst, C.E., Buzza, M.S., Bird, C.H., Warren, H.S., Cameron, P.U., Zhang, M., Ashton-Rickardt, P.G., and Bird, P.I. (2003). The intracellular granzyme B inhibitor, proteinase inhibitor 9, is up-regulated during accessory cell maturation and effector cell degranulation, and its overexpression enhances CTL potency. *J. Immunol.* *170*, 805–815.
- Ho, I.-C., and Miaw, S.-C. (2016). Regulation of IL-4 Expression in Immunity and Diseases. In *Regulation of Cytokine Gene Expression in Immunity and Diseases*, X. Ma, ed. (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 31–77.
- Ho, V.T., and Soiffer, R.J. (2001). The history and future of T-cell depletion as graft-versus-host disease prophylaxis for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* *98*, 3192–3204.

- Ho, J.E., Chen, W.-Y., Chen, M.-H., Larson, M.G., McCabe, E.L., Cheng, S., Ghorbani, A., Coglianesi, E., Emilsson, V., Johnson, A.D., et al. (2013). Common genetic variation at the IL1RL1 locus regulates IL-33/ST2 signaling. *J. Clin. Invest.* *123*, 4208–4218.
- Ho, L.H., Ohno, T., Oboki, K., Kajiwara, N., Suto, H., Iikura, M., Okayama, Y., Akira, S., Saito, H., Galli, S.J., et al. (2007). IL-33 induces IL-13 production by mouse mast cells independently of IgE-FcεRI signals. *J. Leukoc. Biol.* *82*, 1481–1490.
- Hollande, C., Boussier, J., Ziai, J., Nozawa, T., Bondet, V., Phung, W., Lu, B., Duffy, D., Paradis, V., Mallet, V., et al. (2019). Inhibition of the dipeptidyl peptidase DPP4 (CD26) reveals IL-33-dependent eosinophil-mediated control of tumor growth. *Nature Immunology* *20*, 257–264.
- Hong, H.S., Eberhard, J.M., Keudel, P., Bollmann, B.A., Ballmaier, M., Bhatnagar, N., Zielinska-Skowronek, M., Schmidt, R.E., and Meyer-Olson, D. (2010). HIV infection is associated with a preferential decline in less-differentiated CD56dim CD16+ NK cells. *J. Virol.* *84*, 1183–1188.
- Hong, J., Bae, S., Jhun, H., Lee, S., Choi, J., Kang, T., Kwak, A., Hong, K., Kim, E., Jo, S., et al. (2011). Identification of constitutively active interleukin 33 (IL-33) splice variant. *J. Biol. Chem.* *286*, 20078–20086.
- Hornung, V., Rothenfusser, S., Britsch, S., Krug, A., Jahrsdörfer, B., Giese, T., Endres, S., and Hartmann, G. (2002). Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J. Immunol.* *168*, 4531–4537.
- Horowitz, A., Newman, K.C., Evans, J.H., Korb, D.S., Davis, D.M., and Riley, E.M. (2010). Cross-talk between T cells and NK cells generates rapid effector responses to Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *J. Immunol.* *184*, 6043–6052.
- Horowitz, A., Strauss-Albee, D.M., Leipold, M., Kubo, J., Nemat-Gorgani, N., Dogan, O.C., Dekker, C.L., Mackey, S., Maecker, H., Swan, G.E., et al. (2013). Genetic and environmental determinants of human NK cell diversity revealed by mass cytometry. *Sci Transl Med* *5*, 208ra145.
- Horwitz, D.A., Gray, J.D., Ohtsuka, K., Hirokawa, M., and Takahashi, T. (1997). The immunoregulatory effects of NK cells: the role of TGF-β and implications for autoimmunity. *Immunology Today* *18*, 538–542.
- Horwitz, D.A., Gray, J.D., and Ohtsuka, K. (1999). Role of NK cells and TGF-β in the regulation of T-cell-dependent antibody production in health and autoimmune disease. *Microbes and Infection* *1*, 1305–1311.
- Houchins, J.P., Lanier, L.L., Niemi, E.C., Phillips, J.H., and Ryan, J.C. (1997). Natural killer cell cytolytic activity is inhibited by NKG2-A and activated by NKG2-C. *J. Immunol.* *158*, 3603–3609.
- Hoyler, T., Klohe, C.S.N., Souabni, A., Turqueti-Neves, A., Pfeifer, D., Rawlins, E.L., Voehringer, D., Busslinger, M., and Diefenbach, A. (2012). The transcription factor GATA-3 controls cell fate and maintenance of type 2 innate lymphoid cells. *Immunity* *37*, 634–648.
- Hsia, J.-Y., Chen, J.-T., Chen, C.-Y., Hsu, C.-P., Miaw, J., Huang, Y.-S., and Yang, C.-Y. (2005). Prognostic significance of intratumoral natural killer cells in primary resected esophageal squamous cell carcinoma. *Chang Gung Med J* *28*, 335–340.
- Hsieh, C.S., Macatonia, S.E., Tripp, C.S., Wolf, S.F., O'Garra, A., and Murphy, K.M. (1993). Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* *260*, 547–549.
- Hsu, C.-L., and Bryce, P.J. (2012). Inducible IL-33 expression by mast cells is regulated by a calcium-dependent pathway. *J. Immunol.* *189*, 3421–3429.
- 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.
- Hu, H., Sun, J., Wang, C., Bu, X., Liu, X., Mao, Y., and Wang, H. (2017a). IL-33 facilitates endocrine resistance of breast cancer by inducing cancer stem cell properties. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *485*, 643–650.
- Hu, L.-A., Fu, Y., Zhang, D.-N., and Zhang, J. (2013). Serum IL-33 as a diagnostic and prognostic marker in non-small cell lung cancer. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* *14*, 2563–2566.
- Hu, W., Wu, C., Li, X., Zheng, Z., Xie, Q., Deng, X., Jiang, J., and Wu, C. (2017b). Serum IL-33 level is a predictor of progression-free survival after chemotherapy. *Oncotarget* *8*, 35116–35123.
- Hu, Y.S., Zhou, H., Myers, D., Quinn, J.M., Atkins, G.J., Ly, C., Gange, C., Kartsogiannis, V., Elliott, J., Kostakis, P., et al. (2004). Isolation of a Human Homolog of Osteoclast Inhibitory Lectin That Inhibits the Formation and Function of Osteoclasts. *Journal of Bone and Mineral Research* *19*, 89–99.
- Huang, S., Hendriks, W., Althage, A., Hemmi, S., Bluethmann, H., Kamijo, R., Vilcek, J., Zinkernagel, R.M., and Aguet, M. (1993). Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor. *Science* *259*, 1742–1745.
- Huang, Y.-H., Zhu, C., Kondo, Y., Anderson, A.C., Gandhi, A., Russell, A., Dougan, S.K., Petersen, B.-S., Melum, E., Pertel, T., et al. (2015). CEACAM1 regulates TIM-3-mediated tolerance and exhaustion. *Nature* *517*, 386–390.

- Hudak, J.E., Canham, S.M., and Bertozzi, C.R. (2014). Glycocalyx engineering reveals a Siglec-based mechanism for NK cell immunoevasion. *Nat. Chem. Biol.* *10*, 69–75.
- Hudson, C.A., Christophi, G.P., Gruber, R.C., Wilmore, J.R., Lawrence, D.A., and Massa, P.T. (2008). Induction of IL-33 expression and activity in central nervous system glia. *J. Leukoc. Biol.* *84*, 631–643.
- Huenecke, S., Zimmermann, S.Y., Kloess, S., Esser, R., Brinkmann, A., Tramsen, L., Koenig, M., Erben, S., Seidl, C., Tonn, T., et al. (2010). IL-2-driven regulation of NK cell receptors with regard to the distribution of CD16+ and CD16- subpopulations and in vivo influence after haploidentical NK cell infusion. *J. Immunother.* *33*, 200–210.
- Hughes, T., Becknell, B., Freud, A.G., McClory, S., Briercheck, E., Yu, J., Mao, C., Giovenzana, C., Nuovo, G., Wei, L., et al. (2010). Interleukin-1beta selectively expands and sustains interleukin-22+ immature human natural killer cells in secondary lymphoid tissue. *Immunity* *32*, 803–814.
- Humphreys, N.E., Xu, D., Hepworth, M.R., Liew, F.Y., and Grecnis, R.K. (2008). IL-33, a potent inducer of adaptive immunity to intestinal nematodes. *J. Immunol.* *180*, 2443–2449.
- Hunter, C.A., Chizzonite, R., and Remington, J.S. (1995). IL-1 beta is required for IL-12 to induce production of IFN-gamma by NK cells. A role for IL-1 beta in the T cell-independent mechanism of resistance against intracellular pathogens. *J. Immunol.* *155*, 4347–4354.
- Hunter, C.A., Timans, J., Pisacane, P., Menon, S., Cai, G., Walker, W., Aste-Amezaga, M., Chizzonite, R., Bazan, J.F., and Kastelein, R.A. (1997). Comparison of the effects of interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta and interferon-gamma-inducing factor on the production of interferon-gamma by natural killer. *Eur. J. Immunol.* *27*, 2787–2792.
- Huntington, N.D., Tabarias, H., Fairfax, K., Brady, J., Hayakawa, Y., Degli-Esposti, M.A., Smyth, M.J., Tarlinton, D.M., and Nutt, S.L. (2007). NK Cell Maturation and Peripheral Homeostasis Is Associated with KLRG1 Up-Regulation. *The Journal of Immunology* *178*, 4764–4770.
- Huntington, N.D., Legrand, N., Alves, N.L., Jaron, B., Weijer, K., Plet, A., Corcuff, E., Mortier, E., Jacques, Y., Spits, H., et al. (2009). IL-15 trans-presentation promotes human NK cell development and differentiation in vivo. *J. Exp. Med.* *206*, 25–34.
- Hurabielle, C., Thonnart, N., Ram-Wolff, C., Sicard, H., Bensussan, A., Bagot, M., and Marie-Cardine, A. (2017). Usefulness of KIR3DL2 to Diagnose, Follow-Up, and Manage the Treatment of Patients with Sézary Syndrome. *Clin. Cancer Res.* *23*, 3619–3627.
- Hutmacher, C., Gonzalo Núñez, N., Liuzzi, A.R., Becher, B., and Neri, D. (2019). Targeted Delivery of IL2 to the Tumor Stroma Potentiates the Action of Immune Checkpoint Inhibitors by Preferential Activation of NK and CD8+ T Cells. *Cancer Immunol Res* *7*, 572–583.
- Iannello, A., Boulassel, M.-R., Samarani, S., Tremblay, C., Toma, E., Routy, J.-P., and Ahmad, A. (2010). IL-21 enhances NK cell functions and survival in healthy and HIV-infected patients with minimal stimulation of viral replication. *J. Leukoc. Biol.* *87*, 857–867.
- Iguchi-Manaka, A., Kai, H., Yamashita, Y., Shibata, K., Tahara-Hanaoka, S., Honda, S., Yasui, T., Kikutani, H., Shibuya, K., and Shibuya, A. (2008). Accelerated tumor growth in mice deficient in DNAM-1 receptor. *J. Exp. Med.* *205*, 2959–2964.
- Iikura, M., Suto, H., Kajiwara, N., Oboki, K., Ohno, T., Okayama, Y., Saito, H., Galli, S.J., and Nakae, S. (2007). IL-33 can promote survival, adhesion and cytokine production in human mast cells. *Lab. Invest.* *87*, 971–978.
- Iizasa, T., Chang, H., Suzuki, M., Otsuji, M., Yokoi, S., Chiyo, M., Motohashi, S., Yasufuku, K., Sekine, Y., Iyoda, A., et al. (2004). Overexpression of collagen XVIII is associated with poor outcome and elevated levels of circulating serum endostatin in non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* *10*, 5361–5366.
- Ikeda, H., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2002). The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoeediting. *Cytokine Growth Factor Rev.* *13*, 95–109.
- Ilander, M.M., Olsson-Strömberg, U., Lähteenmäki, H., Tiina, K., Koskenvesa, P., Söderlund, S., Höglund, M., Markevärn, B., Sjölander, A., Lotfi, K., et al. (2014). Early Disease Relapse after Tyrosine Kinase Inhibitor Treatment Discontinuation in CML Is Related Both to Low Number and Impaired Function of NK-Cells. *Blood* *124*, 812–812.
- Iliopoulou, E.G., Kountourakis, P., Karamouzis, M.V., Doufexis, D., Ardavanis, A., Baxevanis, C.N., Rigatos, G., Papamichail, M., and Perez, S.A. (2010). A phase I trial of adoptive transfer of allogeneic natural killer cells in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* *59*, 1781–1789.
- Imai, Y. (2019). Interleukin-33 in atopic dermatitis. *Journal of Dermatological Science* *96*, 2–7.
- Imai, C., Iwamoto, S., and Campana, D. (2005). Genetic modification of primary natural killer cells overcomes inhibitory signals and induces specific killing of leukemic cells. *Blood* *106*, 376–383.
- Imai, K., Matsuyama, S., Miyake, S., Suga, K., and Nakachi, K. (2000). Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet* *356*, 1795–1799.

- Imai, Y., Yasuda, K., Sakaguchi, Y., Haneda, T., Mizutani, H., Yoshimoto, T., Nakanishi, K., and Yamanishi, K. (2013). Skin-specific expression of IL-33 activates group 2 innate lymphoid cells and elicits atopic dermatitis-like inflammation in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *110*, 13921–13926.
- 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.
- Ishikawa, E., Tsuboi, K., Saijo, K., Harada, H., Takano, S., Nose, T., and Ohno, T. (2004). Autologous natural killer cell therapy for human recurrent malignant glioma. *Anticancer Res.* *24*, 1861–1871.
- Ishikawa, K., Yagi-Nakanishi, S., Nakanishi, Y., Kondo, S., Tsuji, A., Endo, K., Wakisaka, N., Murono, S., and Yoshizaki, T. (2014). Expression of interleukin-33 is correlated with poor prognosis of patients with squamous cell carcinoma of the tongue. *Auris Nasus Larynx* *41*, 552–557.
- Ishikawa, S., Shimizu, M., Ueno, K., Sugimoto, N., and Yachie, A. (2013). Soluble ST2 as a marker of disease activity in systemic juvenile idiopathic arthritis. *Cytokine* *62*, 272–277.
- Islam, M.S., Horiguchi, K., Iino, S., Kaji, N., Mikawa, S., Hori, M., and Ozaki, H. (2016). Epidermal growth factor is a critical regulator of the cytokine IL-33 in intestinal epithelial cells. *Br. J. Pharmacol.* *173*, 2532–2542.
- Ivashkiv, L.B., and Donlin, L.T. (2014). Regulation of type I interferon responses. *Nat. Rev. Immunol.* *14*, 36–49.
- Iyengar, R., Handgretinger, R., Babarin-Dorner, A., Leimig, T., Otto, M., Geiger, T.L., Holladay, M.S., Houston, J., and Leung, W. (2003). Purification of human natural killer cells using a clinical-scale immunomagnetic method. *Cytotherapy* *5*, 479–484.
- Jacobsen, E.A., Doyle, A.D., Colbert, D.C., Zellner, K.R., Protheroe, C.A., LeSuer, W.E., Lee, N.A., and Lee, J.J. (2015). Differential activation of airway eosinophils induces IL-13-mediated allergic Th2 pulmonary responses in mice. *Allergy* *70*, 1148–1159.
- Jafarzadeh, A., Minaee, K., Farsinejad, A.-R., Nemati, M., Khosravimashizi, A., Daneshvar, H., Mohammadi, M.M., Sheikhi, A., and Ghaderi, A. (2015). Evaluation of the circulating levels of IL-12 and IL-33 in patients with breast cancer: influences of the tumor stages and cytokine gene polymorphisms. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* *18*, 1189–1198.
- Jarahian, M., Watzl, C., Fournier, P., Arnold, A., Djandji, D., Zahedi, S., Cerwenka, A., Paschen, A., Schirmacher, V., and Momburg, F. (2009). Activation of natural killer cells by newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase. *J. Virol.* *83*, 8108–8121.
- Jevtovic, A., Pantic, J., Jovanovic, I., Milovanovic, M., Stanojevic, I., Vojvodic, D., Arsenijevic, N., Lukic, M.L., and Radosavljevic, G.D. (2020). Interleukin-33 pretreatment promotes metastatic growth of murine melanoma by reducing the cytotoxic capacity of CD8⁺ T cells and enhancing regulatory T cells. *Cancer Immunol. Immunother.*
- Jiang, H.-R., Milovanović, M., Allan, D., Niedbala, W., Besnard, A.-G., Fukada, S.Y., Alves-Filho, J.C., Togbe, D., Goodyear, C.S., Lington, C., et al. (2012). IL-33 attenuates EAE by suppressing IL-17 and IFN- γ production and inducing alternatively activated macrophages. *Eur. J. Immunol.* *42*, 1804–1814.
- Jiang, Y., Yang, M., Sun, X., Chen, X., Ma, M., Yin, X., Qian, S., Zhang, Z., Fu, Y., Liu, J., et al. (2018). IL-10⁺ NK and TGF- β ⁺ NK cells play negative regulatory roles in HIV infection. *BMC Infect Dis* *18*, 80.
- Jin, S., Deng, Y., Hao, J.-W., Li, Y., Liu, B., Yu, Y., Shi, F.-D., and Zhou, Q.-H. (2014). NK cell phenotypic modulation in lung cancer environment. *PLoS ONE* *9*, e109976.
- Jin, Z., Lei, L., Lin, D., Liu, Y., Song, Y., Gong, H., Zhu, Y., Mei, Y., Hu, B., Wu, Y., et al. (2018). IL-33 Released in the Liver Inhibits Tumor Growth via Promotion of CD4⁺ and CD8⁺ T Cell Responses in Hepatocellular Carcinoma. *J. Immunol.* *201*, 3770–3779.
- Jochems, C., Fantini, M., Fernando, R.I., Kwilas, A.R., Donahue, R.N., Lepone, L.M., Grenga, I., Kim, Y.-S., Brechbiel, M.W., Gulley, J.L., et al. (2016). The IDO1 selective inhibitor epacadostat enhances dendritic cell immunogenicity and lytic ability of tumor antigen-specific T cells. *Oncotarget* *7*, 37762–37772.
- Johnson, J.L., Georgakilas, G., Petrovic, J., Kurachi, M., Cai, S., Harly, C., Pear, W.S., Bhandoola, A., Wherry, E.J., and Vahedi, G. (2018). Lineage-Determining Transcription Factor TCF-1 Initiates the Epigenetic Identity of T Cells. *Immunity* *48*, 243–257.e10.
- Johnston, L.K., Hsu, C.-L., Krier-Burris, R.A., Chhiba, K.D., Chien, K.B., McKenzie, A., Berdnikovs, S., and Bryce, P.J. (2016). IL-33 Precedes IL-5 in Regulating Eosinophil Commitment and Is Required for Eosinophil Homeostasis. *J. Immunol.* *197*, 3445–3453.
- Jouanguy, E., Lamhamedi-Cherradi, S., Lammas, D., Dorman, S.E., Fondanèche, M.C., Dupuis, S., Döffinger, R., Altare, F., Girdlestone, J., Emile, J.F., et al. (1999). A human IFNGR1 small deletion hotspot associated with dominant susceptibility to mycobacterial infection. *Nat. Genet.* *21*, 370–378.
- Jouliá, R., L'Faqih, F.-E., Valitutti, S., and Espinosa, E. (2017). IL-33 fine tunes mast cell degranulation and chemokine production at the single-cell level. *J. Allergy Clin. Immunol.* *140*, 497–509.e10.

- Jovanovic, I., Radosavljevic, G., Mitrovic, M., Juranic, V.L., McKenzie, A.N.J., Arsenijevic, N., Jonjic, S., and Lukic, M.L. (2011). ST2 deletion enhances innate and acquired immunity to murine mammary carcinoma. *Eur. J. Immunol.* *41*, 1902–1912.
- Jovanovic, I.P., Pejnovic, N.N., Radosavljevic, G.D., Pantic, J.M., Milovanovic, M.Z., Arsenijevic, N.N., and Lukic, M.L. (2014). Interleukin-33/ST2 axis promotes breast cancer growth and metastases by facilitating intratumoral accumulation of immunosuppressive and innate lymphoid cells. *Int. J. Cancer* *134*, 1669–1682.
- Judge, S.J., Dunai, C., Aguilar, E.G., Vick, S.C., Sturgill, I.R., Khuat, L.T., Stoffel, K.M., Van Dyke, J., Longo, D.L., Darrow, M.A., et al. (2020). Minimal PD-1 expression in mouse and human NK cells under diverse conditions. *J. Clin. Invest.*
- Juelke, K., Killig, M., Luetke-Eversloh, M., Parente, E., Gruen, J., Morandi, B., Ferlazzo, G., Thiel, A., Schmitt-Knosalla, I., and Romagnani, C. (2010). CD62L expression identifies a unique subset of polyfunctional CD56dim NK cells. *Blood* *116*, 1299–1307.
- Jung, M.-Y., Smrž, D., Desai, A., Bandara, G., Ito, T., Iwaki, S., Kang, J.-H., Andrade, M.V., Hilderbrand, S.C., Brown, J.M., et al. (2013). IL-33 induces a hyporesponsive phenotype in human and mouse mast cells. *J. Immunol.* *190*, 531–538.
- Kakkar, R., Hei, H., Dobner, S., and Lee, R.T. (2012). Interleukin 33 as a mechanically responsive cytokine secreted by living cells. *J. Biol. Chem.* *287*, 6941–6948.
- Kanda, M., Ohto-Ozaki, H., Kuroiwa, K., Tominaga, S., Watanabe, E., and Iwahana, H. (2006). Elevation of ST2 protein levels in cerebrospinal fluid following subarachnoid hemorrhage. *Acta Neurol. Scand.* *113*, 327–333.
- Kang, X., Kim, J., Deng, M., John, S., Chen, H., Wu, G., Phan, H., and Zhang, C.C. (2015). Inhibitory leukocyte immunoglobulin-like receptors: Immune checkpoint proteins and tumor sustaining factors. *Cell Cycle* *15*, 25–40.
- Kansara, M., Thomson, K., Pang, P., Dutour, A., Mirabello, L., Acher, F., Pin, J.-P., Demicco, E.G., Yan, J., Teng, M.W.L., et al. (2019). Infiltrating Myeloid Cells Drive Osteosarcoma Progression via GRM4 Regulation of IL23. *Cancer Discov* *9*, 1511–1519.
- 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.
- Kaplan, M.H., Sun, Y.L., Hoey, T., and Grusby, M.J. (1996). Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. *Nature* *382*, 174–177.
- 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.
- Kasaian, M.T., Whitters, M.J., Carter, L.L., Lowe, L.D., Jussif, J.M., Deng, B., Johnson, K.A., Witek, J.S., Senices, M., Konz, R.F., et al. (2002). IL-21 limits NK cell responses and promotes antigen-specific T cell activation: a mediator of the transition from innate to adaptive immunity. *Immunity* *16*, 559–569.
- Kashii, Y., Giorda, R., Herberman, R.B., Whiteside, T.L., and Vujanovic, N.L. (1999). Constitutive expression and role of the TNF family ligands in apoptotic killing of tumor cells by human NK cells. *J. Immunol.* *163*, 5358–5366.
- Kearley, J., Silver, J.S., Sanden, C., Liu, Z., Berlin, A.A., White, N., Mori, M., Pham, T.-H., Ward, C.K., Criner, G.J., et al. (2015). Cigarette smoke silences innate lymphoid cell function and facilitates an exacerbated type I interleukin-33-dependent response to infection. *Immunity* *42*, 566–579.
- Kehrl, J.H., Dukovich, M., Whalen, G., Katz, P., Fauci, A.S., and Greene, W.C. (1988). Novel interleukin 2 (IL-2) receptor appears to mediate IL-2-induced activation of natural killer cells. *J. Clin. Invest.* *81*, 200–205.
- Kelly, J.M., Darcy, P.K., Markby, J.L., Godfrey, D.I., Takeda, K., Yagita, H., and Smyth, M.J. (2002). Induction of tumor-specific T cell memory by NK cell-mediated tumor rejection. *Nat. Immunol.* *3*, 83–90.
- Kelly, J.M., Waterhouse, N.J., Cretney, E., Browne, K.A., Ellis, S., Trapani, J.A., and Smyth, M.J. (2004). Granzyme M Mediates a Novel Form of Perforin-dependent Cell Death. *J. Biol. Chem.* *279*, 22236–22242.
- Kerbaui, L.N., Ang, S., Liu, E., Banerjee, P.P., Wu, Y., Shaim, H., Lim, F.L.W.I., Basar, R., Li, L., Muftuoglu, M., et al. (2017). Cord Blood NK Cells Engineered to Express a Humanized CD123-Targeted Chimeric Antigen Receptor (CAR) and IL-15 As Off-the-Shelf Therapy for Acute Myeloid Leukemia. *Blood* *130*, 4453–4453.
- Kermer, V., Baum, V., Hornig, N., Kontermann, R.E., and Müller, D. (2012). An Antibody Fusion Protein for Cancer Immunotherapy Mimicking IL-15 trans-Presentation at the Tumor Site. *Mol Cancer Ther* *11*, 1279–1288.
- Khoder, A., Alsuliman, A., Basar, R., Sobieski, C., Kondo, K., Alousi, A.M., Szydlo, R., Muftuoglu, M., Shaim, H., Apperley, J.F., et al. (2018). Evidence for B Cell Exhaustion in Chronic Graft-versus-Host Disease. *Front. Immunol.* *8*.

- Kieler, M., Unseld, M., Demyanets, S., Bianconi, D., and Prager, G. (2017). Plasma levels of interleukin-33 (IL-33) and soluble suppression of tumorigenicity 2 (sST2) as a potential predictive biomarker in patients (pts) with advanced pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) undergoing systemic chemotherapy (sCTX). *Annals of Oncology* 28, xi11–xi12.
- Kiessling, R., Klein, E., Pross, H., and Wigzell, H. (1975). "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.
- Kim, D.H., Kamel-Reid, S., Chang, H., Sutherland, R., Jung, C.W., Kim, H.-J., Lee, J.-J., and Lipton, J.H. (2009). Natural killer or natural killer/T cell lineage large granular lymphocytosis associated with dasatinib therapy for Philadelphia chromosome positive leukemia. *Haematologica* 94, 135–139.
- Kim, J., Kim, W., Moon, U.J., Kim, H.J., Choi, H.-J., Sin, J.-I., Park, N.H., Cho, H.R., and Kwon, B. (2016). Intratumorally Establishing Type 2 Innate Lymphoid Cells Blocks Tumor Growth. *J. I.* 196, 2410–2423.
- Kim, J.Y., Lim, S.-C., Kim, G., Yun, H.J., Ahn, S.-G., and Choi, H.S. (2015a). Interleukin-33/ST2 axis promotes epithelial cell transformation and breast tumorigenesis via upregulation of COT activity. *Oncogene* 34, 4928–4938.
- Kim, M.S., Kim, E., Heo, J.-S., Bae, D.-J., Lee, J.-U.W., Lee, T.-H., Lee, H.J., Chang, H.S., Park, J.S., Jang, A.S., et al. (2015b). Circulating IL-33 level is associated with the progression of lung cancer. *Lung Cancer* 90, 346–351.
- Kischkel, F.C., Lawrence, D.A., Tinel, A., LeBlanc, H., Virmani, A., Schow, P., Gazdar, A., Blenis, J., Arnott, D., and Ashkenazi, A. (2001). Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *J. Biol. Chem.* 276, 46639–46646.
- Kitaura, M., Nakajima, T., Imai, T., Harada, S., Combadiere, C., Tiffany, H.L., Murphy, P.M., and Yoshie, O. (1996). Molecular cloning of human eotaxin, an eosinophil-selective CC chemokine, and identification of a specific eosinophil eotaxin receptor, CC chemokine receptor 3. *J. Biol. Chem.* 271, 7725–7730.
- Klapdor, R., Wang, S., Hacker, U., Büning, H., Morgan, M., Dörk, T., Hillemanns, P., and Schambach, A. (2017). Improved Killing of Ovarian Cancer Stem Cells by Combining a Novel Chimeric Antigen Receptor-Based Immunotherapy and Chemotherapy. *Hum. Gene Ther.* 28, 886–896.
- Klimosch, S.N., Bartel, Y., Wiemann, S., and Steinle, A. (2013). Genetically coupled receptor-ligand pair Nkp80-AICL enables autonomous control of human NK cell responses. *Blood* 122, 2380–2389.
- Klingemann, H. (2014). Are natural killer cells superior CAR drivers? *Oncolimmunology* 3, e28147.
- Klingemann, H., Boissel, L., and Toneguzzo, F. (2016). Natural Killer Cells for Immunotherapy - Advantages of the NK-92 Cell Line over Blood NK Cells. *Front Immunol* 7, 91.
- Kobayashi, H., Dubois, S., Sato, N., Sabzevari, H., Sakai, Y., Waldmann, T.A., and Tagaya, Y. (2005). Role of trans-cellular IL-15 presentation in the activation of NK cell-mediated killing, which leads to enhanced tumor immunosurveillance. *Blood* 105, 721–727.
- Kobayashi, M., Fitz, L., Ryan, M., Hewick, R.M., Clark, S.C., Chan, S., Loudon, R., Sherman, F., Perussia, B., and Trinchieri, G. (1989). Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J. Exp. Med.* 170, 827–845.
- Kobori, A., Yagi, Y., Imaeda, H., Ban, H., Bamba, S., Tsujikawa, T., Saito, Y., Fujiyama, Y., and Andoh, A. (2010). Interleukin-33 expression is specifically enhanced in inflamed mucosa of ulcerative colitis. *J. Gastroenterol.* 45, 999–1007.
- Koehl, U., Sörensen, J., Esser, R., Zimmermann, S., Grüttner, H.P., Tonn, T., Seidl, C., Seifried, E., Klingebiel, T., and Schwabe, D. (2004). IL-2 activated NK cell immunotherapy of three children after haploidentical stem cell transplantation. *Blood Cells Mol. Dis.* 33, 261–266.
- Kohler, A., Büchi, I., Melin, N., Bayer, F., McCoy, K., Candinas, D., and Stroka, D. (2018). The IL-33/ST2 axes contributes to hepatocyte proliferation and promotes development of hepatocellular carcinoma. *HPB* 20, S261.
- Kohrt, H.E., Houot, R., Marabelle, A., Cho, H.J., Osman, K., Goldstein, M., Levy, R., and Brody, J. (2012). Combination strategies to enhance antitumor ADCC. *Immunotherapy* 4, 511–527.
- Kolodin, D., van Panhuys, N., Li, C., Magnuson, A.M., Cipolletta, D., Miller, C.M., Wagers, A., Germain, R.N., Benoist, C., and Mathis, D. (2015). Antigen- and cytokine-driven accumulation of regulatory T cells in visceral adipose tissue of lean mice. *Cell Metab.* 21, 543–557.
- Komai-Koma, M., Xu, D., Li, Y., McKenzie, A.N.J., McInnes, I.B., and Liew, F.Y. (2007). IL-33 is a chemoattractant for human Th2 cells. *Eur. J. Immunol.* 37, 2779–2786.
- Komai-Koma, M., Gilchrist, D.S., McKenzie, A.N.J., Goodyear, C.S., Xu, D., and Liew, F.Y. (2011). IL-33 Activates B1 Cells and Exacerbates Contact Sensitivity. *The Journal of Immunology* 186, 2584–2591.

- Kondo, Y., Yoshimoto, T., Yasuda, K., Futatsugi-Yumikura, S., Morimoto, M., Hayashi, N., Hoshino, T., Fujimoto, J., and Nakanishi, K. (2008). Administration of IL-33 induces airway hyperresponsiveness and goblet cell hyperplasia in the lungs in the absence of adaptive immune system. *Int. Immunol.* *20*, 791–800.
- Koopman, L.A., Corver, W.E., van der Slik, A.R., Giphart, M.J., and Fleuren, G.J. (2000). Multiple genetic alterations cause frequent and heterogeneous human histocompatibility leukocyte antigen class I loss in cervical cancer. *J. Exp. Med.* *191*, 961–976.
- Koopman, L.A., Kopcow, H.D., Rybalov, B., Boyson, J.E., Orange, J.S., Schatz, F., Masch, R., Lockwood, C.J., Schachter, A.D., Park, P.J., et al. (2003). Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential. *J. Exp. Med.* *198*, 1201–1212.
- Kopp, H.-G., Placke, T., and Salih, H.R. (2009). Platelet-derived transforming growth factor-beta down-regulates NKG2D thereby inhibiting natural killer cell antitumor reactivity. *Cancer Res.* *69*, 7775–7783.
- Koster, R., Panagiotou, O.A., Wheeler, W.A., Karlins, E., Gastier-Foster, J.M., Caminada de Toledo, S.R., Petrilli, A.S., Flanagan, A.M., Tirabosco, R., Andrulis, I.L., et al. (2018). Genome-wide association study identifies the GLDC/IL33 locus associated with survival of osteosarcoma patients. *Int. J. Cancer* *142*, 1594–1601.
- Kotsiou, O.S., Gourgoulis, K.I., and Zarogiannis, S.G. (2018). IL-33/ST2 Axis in Organ Fibrosis. *Front Immunol* *9*.
- Kouzaki, H., Iijima, K., Kobayashi, T., O'Grady, S.M., and Kita, H. (2011). The danger signal, extracellular ATP, is a sensor for an airborne allergen and triggers IL-33 release and innate Th2-type responses. *J. Immunol.* *186*, 4375–4387.
- Krämer, B., Eisenhardt, M., Glässner, A., Körner, C., Sauerbruch, T., Spengler, U., and Nattermann, J. (2011). Do λ -IFNs IL28A and IL28B act on human natural killer cells? *PNAS* *108*, E519–E520.
- Krasnova, Y., Putz, E.M., Smyth, M.J., and Souza-Fonseca-Guimaraes, F. (2017). Bench to bedside: NK cells and control of metastasis. *Clin. Immunol.* *177*, 50–59.
- Kreutzman, A., Juvonen, V., Kairisto, V., Ekblom, M., Stenke, L., Seggewiss, R., Porkka, K., and Mustjoki, S. (2010). Mono/oligoclonal T and NK cells are common in chronic myeloid leukemia patients at diagnosis and expand during dasatinib therapy. *Blood* *116*, 772–782.
- Krueger, P.D., Lassen, M.G., Qiao, H., and Hahn, Y.S. (2011). Regulation of NK cell repertoire and function in the liver. *Crit. Rev. Immunol.* *31*, 43–52.
- Kruse, P.H., Matta, J., Ugolini, S., and Vivier, E. (2014). Natural cytotoxicity receptors and their ligands. *Immunol. Cell Biol.* *92*, 221–229.
- Küchler, A.M., Pollheimer, J., Balogh, J., Sponheim, J., Manley, L., Sorensen, D.R., De Angelis, P.M., Scott, H., and Haraldsen, G. (2008). Nuclear interleukin-33 is generally expressed in resting endothelium but rapidly lost upon angiogenic or proinflammatory activation. *Am. J. Pathol.* *173*, 1229–1242.
- Kumar, S., Tzimas, M.N., Griswold, D.E., and Young, P.R. (1997). Expression of ST2, an Interleukin-1 Receptor Homologue, Is Induced by Proinflammatory Stimuli. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *235*, 474–478.
- Kurowska-Stolarska, M., Kewin, P., Murphy, G., Russo, R.C., Stolarski, B., Garcia, C.C., Komai-Koma, M., Pitman, N., Li, Y., Niedbala, W., et al. (2008). IL-33 induces antigen-specific IL-5+ T cells and promotes allergic-induced airway inflammation independent of IL-4. *J. Immunol.* *181*, 4780–4790.
- Kurowska-Stolarska, M., Stolarski, B., Kewin, P., Murphy, G., Corrigan, C.J., Ying, S., Pitman, N., Mirchandani, A., Rana, B., van Rooijen, N., et al. (2009). IL-33 amplifies the polarization of alternatively activated macrophages that contribute to airway inflammation. *J. Immunol.* *183*, 6469–6477.
- Kuswanto, W., Burzyn, D., Panduro, M., Wang, K.K., Jang, Y.C., Wagers, A.J., Benoist, C., and Mathis, D. (2016). Poor Repair of Skeletal Muscle in Aging Mice Reflects a Defect in Local, Interleukin-33-Dependent Accumulation of Regulatory T Cells. *Immunity* *44*, 355–367.
- 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.
- Lam, E.P.S., Kariyawasam, H.H., Rana, B.M.J., Durham, S.R., McKenzie, A.N.J., Powell, N., Orban, N., Lennartz-Walker, M., Hopkins, C., Ying, S., et al. (2016). IL-25/IL-33-responsive TH2 cells characterize nasal polyps with a default TH17 signature in nasal mucosa. *J. Allergy Clin. Immunol.* *137*, 1514–1524.
- Lampinen, M., Rak, S., and Venge, P. (1999). The role of interleukin-5, interleukin-8 and RANTES in the chemotactic attraction of eosinophils to the allergic lung. *Clin. Exp. Allergy* *29*, 314–322.
- Landskron, G., De la Fuente López, M., Dubois-Camacho, K., Díaz-Jiménez, D., Orellana-Serradell, O., Romero, D., Sepúlveda, S.A., Salazar, C., Parada-Venegas, D., Quera, R., et al. (2019). Interleukin 33/ST2 Axis Components Are Associated to Desmoplasia, a Metastasis-Related Factor in Colorectal Cancer. *Front. Immunol.* *10*.

- Lanier, L.L., Ruitenberg, J.J., and Phillips, J.H. (1988). Functional and biochemical analysis of CD16 antigen on natural killer cells and granulocytes. *J. Immunol.* *141*, 3478–3485.
- Lanier, L.L., Corliss, B., Wu, J., and Phillips, J.H. (1998). Association of DAP12 with activating CD94/NKG2C NK cell receptors. *Immunity* *8*, 693–701.
- Laouar, Y., Sutterwala, F.S., Gorelik, L., and Flavell, R.A. (2005). Transforming growth factor-beta controls T helper type 1 cell development through regulation of natural killer cell interferon-gamma. *Nat. Immunol.* *6*, 600–607.
- Laroni, A., Gandhi, R., Beynon, V., and Weiner, H.L. (2011). IL-27 imparts immunoregulatory function to human NK cell subsets. *PLoS ONE* *6*, e26173.
- Latiano, A., Palmieri, O., Pastorelli, L., Vecchi, M., Pizarro, T.T., Bossa, F., Merla, G., Augello, B., Latiano, T., Corritore, G., et al. (2013). Associations between genetic polymorphisms in IL-33, IL1R1 and risk for inflammatory bowel disease. *PLoS ONE* *8*, e62144.
- Lau, C.M., Adams, N.M., Geary, C.D., Weizman, O.-E., Rapp, M., Pritykin, Y., Leslie, C.S., and Sun, J.C. (2018). Epigenetic control of innate and adaptive immune memory. *Nat. Immunol.* *19*, 963–972.
- Lauwerys, B.R., Renaud, J.C., and Houssiau, F.A. (1999). Synergistic proliferation and activation of natural killer cells by interleukin 12 and interleukin 18. *Cytokine* *11*, 822–830.
- Lauzon, N.M., Mian, F., MacKenzie, R., and Ashkar, A.A. (2006). The direct effects of Toll-like receptor ligands on human NK cell cytokine production and cytotoxicity. *Cell. Immunol.* *241*, 102–112.
- Lavergne, E., Combadière, B., Bonduelle, O., Iga, M., Gao, J.-L., Maho, M., Boissonnas, A., Murphy, P.M., Debré, P., and Combadière, C. (2003). Fractalkine mediates natural killer-dependent antitumor responses in vivo. *Cancer Res.* *63*, 7468–7474.
- Lavin, Y., Kobayashi, S., Leader, A., Amir, E.D., Elefant, N., Bigenwald, C., Remark, R., Sweeney, R., Becker, C.D., Levine, J.H., et al. (2017). Innate Immune Landscape in Early Lung Adenocarcinoma by Paired Single-Cell Analyses. *Cell* *169*, 750-765.e17.
- Law, R.H.P., Lukoyanova, N., Voskoboinik, I., Caradoc-Davies, T.T., Baran, K., Dunstone, M.A., D'Angelo, M.E., Orlova, E.V., Coulibaly, F., Verschoor, S., et al. (2010). The structural basis for membrane binding and pore formation by lymphocyte perforin. *Nature* *468*, 447–451.
- Le Goffic, R., Arshad, M.I., Rauch, M., L'Helgoualc'h, A., Delmas, B., Piquet-Pellorce, C., and Samson, M. (2011). Infection with influenza virus induces IL-33 in murine lungs. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *45*, 1125–1132.
- Lebbink, R.J., de Ruiter, T., Adelmeijer, J., Brenkman, A.B., van Helvoort, J.M., Koch, M., Farnsdale, R.W., Lisman, T., Sonnenberg, A., Lenting, P.J., et al. (2006). Collagens are functional, high affinity ligands for the inhibitory immune receptor LAIR-1. *J Exp Med* *203*, 1419–1425.
- LeBlanc, H.N., and Ashkenazi, A. (2003). Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors. *Cell Death & Differentiation* *10*, 66–75.
- Lécart, S., Lecoite, N., Subramaniam, A., Alkan, S., Ni, D., Chen, R., Boulay, V., Pène, J., Kuroiwa, K., Tominaga, S., et al. (2002). Activated, but not resting human Th2 cells, in contrast to Th1 and T regulatory cells, produce soluble ST2 and express low levels of ST2L at the cell surface. *Eur. J. Immunol.* *32*, 2979–2987.
- Lee, J.-C., Lee, K.-M., Kim, D.-W., and Heo, D.S. (2004). Elevated TGF-beta1 secretion and down-modulation of NKG2D underlies impaired NK cytotoxicity in cancer patients. *J. Immunol.* *172*, 7335–7340.
- Lee, M.-W., Odegaard, J.I., Mukundan, L., Qiu, Y., Molofsky, A.B., Nussbaum, J.C., Yun, K., Locksley, R.M., and Chawla, A. (2015). Activated type 2 innate lymphoid cells regulate beige fat biogenesis. *Cell* *160*, 74–87.
- Lefrançois, E., Roga, S., Gautier, V., Gonzalez-de-Peredo, A., Monsarrat, B., Girard, J.-P., and Cayrol, C. (2012). IL-33 is processed into mature bioactive forms by neutrophil elastase and cathepsin G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *109*, 1673–1678.
- Lefrançois, E., Duval, A., Mirey, E., Roga, S., Espinosa, E., Cayrol, C., and Girard, J.-P. (2014). Central domain of IL-33 is cleaved by mast cell proteases for potent activation of group-2 innate lymphoid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *111*, 15502–15507.
- Leivonen, M., Nordling, S., Lundin, J., von Boguslawski, K., and Haglund, C. (2001). STn and prognosis in breast cancer. *Oncology* *61*, 299–305.
- Leong, J.W., Chase, J.M., Romee, R., Schneider, S.E., Sullivan, R.P., Cooper, M.A., and Fehniger, T.A. (2014). Preactivation with IL-12, IL-15, and IL-18 induces CD25 and a functional high-affinity IL-2 receptor on human cytokine-induced memory-like natural killer cells. *Biol. Blood Marrow Transplant.* *20*, 463–473.
- Lettau, M., Schmidt, H., Kabelitz, D., and Janssen, O. (2007). Secretory lysosomes and their cargo in T and NK cells. *Immunol. Lett.* *108*, 10–19.
- Levescot, A., Flamant, S., Basbous, S., Jacomet, F., Féraud, O., Anne Bourgeois, E., Bonnet, M.-L., Giraud, C., Roy, L., Barra, A., et al. (2014). BCR-ABL-induced deregulation of the IL-33/ST2 pathway in CD34+ progenitors from chronic myeloid leukemia patients. *Cancer Res.* *74*, 2669–2676.

- Levin, A.M., Bates, D.L., Ring, A.M., Krieg, C., Lin, J.T., Su, L., Moraga, I., Raeber, M.E., Bowman, G.R., Novick, P., et al. (2012). Exploiting a natural conformational switch to engineer an interleukin-2 'superkine.' *Nature* *484*, 529–533.
- 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.
- Levi-Schaffer, F., Temkin, V., Malamud, V., Feld, S., and Zilberman, Y. (1998). Mast cells enhance eosinophil survival in vitro: role of TNF-alpha and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J. Immunol.* *160*, 5554–5562.
- Li, A., Herbst, R.H., Canner, D., Schenkel, J.M., Smith, O.C., Kim, J.Y., Hillman, M., Bhutkar, A., Cuoco, M.S., Rappazzo, C.G., et al. (2019a). IL-33 Signaling Alters Regulatory T Cell Diversity in Support of Tumor Development. *Cell Reports* *29*, 2998-3008.e8.
- Li, H., Tago, K., Ito, K., Kuroiwa, K., Arai, T., Iwahana, H., Tominaga, S., and Yanagisawa, K. (2000). The cloning and nucleotide sequence of human ST2L cDNA. *Genomics* *67*, 284–290.
- Li, H., Han, Y., Guo, Q., Zhang, M., and Cao, X. (2009). Cancer-expanded myeloid-derived suppressor cells induce anergy of NK cells through membrane-bound TGF-beta 1. *J. Immunol.* *182*, 240–249.
- Li, H., van der Leun, A.M., Yofe, I., Lubling, Y., Gelbard-Solodkin, D., van Akkooi, A.C.J., van den Braber, M., Rozeman, E.A., Haanen, J.B.A.G., Blank, C.U., et al. (2019b). Dysfunctional CD8 T Cells Form a Proliferative, Dynamically Regulated Compartment within Human Melanoma. *Cell* *176*, 775-789.e18.
- Li, J., Razumilava, N., Gores, G.J., Walters, S., Mizuochi, T., Mourya, R., Bessho, K., Wang, Y.-H., Glaser, S.S., Shivakumar, P., et al. (2014). Biliary repair and carcinogenesis are mediated by IL-33-dependent cholangiocyte proliferation. *J. Clin. Invest.* *124*, 3241–3251.
- Li, Q., Ye, L.-J., Ren, H.-L., Huyan, T., Li, J., Shi, J.-L., and Huang, Q.-S. (2015). Multiple effects of IL-21 on human NK cells in ex vivo expansion. *Immunobiology* *220*, 876–888.
- Li, Y., Shi, J., Qi, S., Zhang, J., Peng, D., Chen, Z., Wang, G., Wang, Z., and Wang, L. (2018). IL-33 facilitates proliferation of colorectal cancer dependent on COX2/PGE2. *J Exp Clin Cancer Res* *37*, 196.
- Li, Y.-H., Zhou, W.-H., Tao, Y., Wang, S.-C., Jiang, Y.-L., Zhang, D., Piao, H.-L., Fu, Q., Li, D.-J., and Du, M.-R. (2016). The Galectin-9/Tim-3 pathway is involved in the regulation of NK cell function at the maternal-fetal interface in early pregnancy. *Cell. Mol. Immunol.* *13*, 73–81.
- Li, Z.-H., Han, B.-W., and Zhang, X.-F. (2019c). A functional polymorphism in the promoter region of IL-33 is associated with the reduced risk of colorectal cancer. *Biomarkers in Medicine* *13*, 567–575.
- Liang, M., Liwen, Z., Yun, Z., Yanbo, D., and Jianping, C. (2018). Serum Levels of IL-33 and Correlation with IL-4, IL-17A, and Hypergammaglobulinemia in Patients with Autoimmune Hepatitis (Hindawi).
- Liang, S., Wei, H., Sun, R., and Tian, Z. (2003). IFNalpha regulates NK cell cytotoxicity through STAT1 pathway. *Cytokine* *23*, 190–199.
- Liang, Y., Yi, P., Jie, Z., Yuan, D.D.M.K., Soong, L., Cong, Y., and Sun, J. (2017). IL-33 promotes antiviral CD8+ T cells through the mTORC1 pathway and limits liver injury via recruiting immunosuppressive neutrophils. *The Journal of Immunology* *198*, 78.3-78.3.
- Liang, Y., Yi, P., Yuan, D.M.K., Jie, Z., Kwota, Z., Soong, L., Cong, Y., and Sun, J. (2019). IL-33 induces immunosuppressive neutrophils via a type 2 innate lymphoid cell/IL-13/STAT6 axis and protects the liver against injury in LCMV infection-induced viral hepatitis. *Cell. Mol. Immunol.* *16*, 126–137.
- Liao, N., Bix, M., Zijlstra, M., Jaenisch, R., and Raulet, D. (1991). MHC class I deficiency: susceptibility to natural killer (NK) cells and impaired NK activity. *Science* *253*, 199–202.
- Liao, W., Lin, J.-X., and Leonard, W.J. (2011). IL-2 family cytokines: new insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation. *Curr. Opin. Immunol.* *23*, 598–604.
- 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.* *189*, 1491–1499.
- Liesche, C., Sauer, P., Prager, I., Urlaub, D., Claus, M., Eils, R., Beaudouin, J., and Watzl, C. (2018). Single-Fluorescent Protein Reporters Allow Parallel Quantification of Natural Killer Cell-Mediated Granzyme and Caspase Activities in Single Target Cells. *Front. Immunol.* *9*.
- Liew, F.Y., Girard, J.-P., and Turnquist, H.R. (2016). Interleukin-33 in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* *16*, 676–689.
- Lim, O., Lee, Y., Chung, H., Her, J.H., Kang, S.M., Jung, M., Min, B., Shin, H., Kim, T.M., Heo, D.S., et al. (2013a). GMP-compliant, large-scale expanded allogeneic natural killer cells have potent cytolytic activity against cancer cells in vitro and in vivo. *PLoS ONE* *8*, e53611.

- Lim, S.A., Kim, T.-J., Lee, J.E., Sonn, C.H., Kim, K., Kim, J., Choi, J.G., Choi, I.-K., Yun, C.-O., Kim, J.-H., et al. (2013b). Ex vivo expansion of highly cytotoxic human NK cells by cocultivation with irradiated tumor cells for adoptive immunotherapy. *Cancer Res.* *73*, 2598–2607.
- Lin, J.T., Martin, S.L., Xia, L., and Gorham, J.D. (2005). TGF- β 1 Uses Distinct Mechanisms to Inhibit IFN- γ Expression in CD4+ T Cells at Priming and at Recall: Differential Involvement of Stat4 and T-bet. *The Journal of Immunology* *174*, 5950–5958.
- Lin, J.X., Migone, T.S., Tsang, M., Friedmann, M., Weatherbee, J.A., Zhou, L., Yamauchi, A., Bloom, E.T., Mietz, J., and John, S. (1995). The role of shared receptor motifs and common Stat proteins in the generation of cytokine pleiotropy and redundancy by IL-2, IL-4, IL-7, IL-13, and IL-15. *Immunity* *2*, 331–339.
- Lingel, A., Weiss, T.M., Niebuhr, M., Pan, B., Appleton, B.A., Wiesmann, C., Bazan, J.F., and Fairbrother, W.J. (2009). Structure of IL-33 and its interaction with the ST2 and IL-1RAcP receptors--insight into heterotrimeric IL-1 signaling complexes. *Structure* *17*, 1398–1410.
- Linnemann, C., Heemskerck, 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.
- Liu, C., Lou, Y., Lizée, G., Qin, H., Liu, S., Rabinovich, B., Kim, G.J., Wang, Y.-H., Ye, Y., Sikora, A.G., et al. (2008a). Plasmacytoid dendritic cells induce NK cell-dependent, tumor antigen-specific T cell cross-priming and tumor regression in mice. *J. Clin. Invest.* *118*, 1165–1175.
- Liu, D., Peterson, M.E., and Long, E.O. (2012). The adaptor protein Crk controls activation and inhibition of natural killer cells. *Immunity* *36*, 600–611.
- Liu, E., Tong, Y., Dotti, G., Shaim, H., Savoldo, B., Mukherjee, M., Orange, J., Wan, X., Lu, X., Reynolds, A., et al. (2018). Cord blood NK cells engineered to express IL-15 and a CD19-targeted CAR show long-term persistence and potent antitumor activity. *Leukemia* *32*, 520–531.
- Liu, E., Marin, D., Banerjee, P., Macapinlac, H.A., Thompson, P., Basar, R., Nassif Kerbauy, L., Overman, B., Thall, P., Kaplan, M., et al. (2020). Use of CAR-Transduced Natural Killer Cells in CD19-Positive Lymphoid Tumors. *N. Engl. J. Med.* *382*, 545–553.
- Liu, J., Shen, J.-X., Hu, J.-L., Huang, W.-H., and Zhang, G.-J. (2014a). Significance of interleukin-33 and its related cytokines in patients with breast cancers. *Front Immunol* *5*, 141.
- Liu, L., Wang, S., Shan, B., Shao, L., Sato, A., Kawamura, K., Li, Q., Ma, G., and Tagawa, M. (2008b). IL-27-mediated activation of natural killer cells and inflammation produced antitumor effects for human oesophageal carcinoma cells. *Scand. J. Immunol.* *68*, 22–29.
- Liu, X., Zhu, L., Lu, X., Bian, H., Wu, X., Yang, W., and Qin, Q. (2014b). IL-33/ST2 pathway contributes to metastasis of human colorectal cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *453*, 486–492.
- Llibre, A., Garner, L., Partridge, A., Freeman, G.J., Klenerman, P., and Willberg, C.B. (2016). Expression of lectin-like transcript-1 in human tissues. *F1000Res* *5*, 2929.
- Loetscher, P., Seitz, M., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M., and Moser, B. (1996). Activation of NK cells by CC chemokines. Chemotaxis, Ca²⁺ mobilization, and enzyme release. *J. Immunol.* *156*, 322–327.
- Löhning, M., Stroehmann, A., Coyle, A.J., Grogan, J.L., Lin, S., Gutierrez-Ramos, J.C., Levinson, D., Radbruch, A., and Kamradt, T. (1998). T1/ST2 is preferentially expressed on murine Th2 cells, independent of interleukin 4, interleukin 5, and interleukin 10, and important for Th2 effector function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *95*, 6930–6935.
- Lonial, S., Dimopoulos, M., Palumbo, A., White, D., Grosicki, S., Spicka, I., Walter-Croneck, A., Moreau, P., Mateos, M.-V., Magen, H., et al. (2015). Elotuzumab Therapy for Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *N. Engl. J. Med.* *373*, 621–631.
- López-Soto, A., Huergo-Zapico, L., Galván, J.A., Rodrigo, L., de Herrerros, A.G., Astudillo, A., and Gonzalez, S. (2013). Epithelial-mesenchymal transition induces an antitumor immune response mediated by NKG2D receptor. *J. Immunol.* *190*, 4408–4419.
- Lopez-Vergès, S., Milush, J.M., Pandey, S., York, V.A., Arakawa-Hoyt, J., Pircher, H., Norris, P.J., Nixon, D.F., and Lanier, L.L. (2010). CD57 defines a functionally distinct population of mature NK cells in the human CD56dimCD16+ NK-cell subset. *Blood* *116*, 3865–3874.
- Lopez-Vergès, S., Milush, J.M., Schwartz, B.S., Pando, M.J., Jarjoura, J., York, V.A., Houchins, J.P., Miller, S., Kang, S.-M., Norris, P.J., et al. (2011). Expansion of a unique CD57⁺NKG2Chi natural killer cell subset during acute human cytomegalovirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *108*, 14725–14732.
- Lu, D.-P., Zhou, X.-Y., Yao, L.-T., Liu, C.-G., Ma, W., Jin, F., and Wu, Y.-F. (2014). Serum soluble ST2 is associated with ER-positive breast cancer. *BMC Cancer* *14*, 198.
- Lu, L., Ikizawa, K., Hu, D., Werneck, M.B.F., Wucherpfennig, K.W., and Cantor, H. (2007). Regulation of Activated CD4+ T Cells by NK Cells via the Qa-1–NKG2A Inhibitory Pathway. *Immunity* *26*, 593–604.

- Lucarini, V., Ziccheddu, G., Macchia, I., La Sorsa, V., Peschiaroli, F., Buccione, C., Sistigu, A., Sanchez, M., Andreone, S., D'Urso, M.T., et al. (2017). IL-33 restricts tumor growth and inhibits pulmonary metastasis in melanoma-bearing mice through eosinophils. *Oncoimmunology* 6, e1317420.
- Luevano, M., Daryouzeh, M., Alnabhan, R., Querol, S., Khakoo, S., Madrigal, A., and Saudemont, A. (2012a). The unique profile of cord blood natural killer cells balances incomplete maturation and effective killing function upon activation. *Hum. Immunol.* 73, 248–257.
- Luevano, M., Madrigal, A., and Saudemont, A. (2012b). Transcription factors involved in the regulation of natural killer cell development and function: an update. *Front Immunol* 3, 319.
- Lüthi, A.U., Cullen, S.P., McNeela, E.A., Duriez, P.J., Afonina, I.S., Sheridan, C., Brumatti, G., Taylor, R.C., Kersse, K., Vandenabeele, P., et al. (2009). Suppression of interleukin-33 bioactivity through proteolysis by apoptotic caspases. *Immunity* 31, 84–98.
- Lutz, C.T., Karapetyan, A., Al-Attar, A., Shelton, B.J., Holt, K.J., Tucker, J.H., and Presnell, S.R. (2011). Human natural killer cells proliferate and die in vivo more rapidly than T cells in healthy young and elderly adults. *J Immunol* 186, 4590–4598.
- Luzina, I.G., Clerman, A., Fischevich, R., Todd, N.W., Lockett, V., and Atamas, S.P. (2019). Identification of the IL-33 protein segment that controls subcellular localization, extracellular secretion, and functional maturation. *Cytokine* 119, 1–6.
- Mace, E.M., Dongre, P., Hsu, H.-T., Sinha, P., James, A.M., Mann, S.S., Forbes, L.R., Watkin, L.B., and Orange, J.S. (2014). Cell biological steps and checkpoints in accessing NK cell cytotoxicity. *Immunol. Cell Biol.* 92, 245–255.
- MacFarlane, A.W., Jilab, M., Plimack, E.R., Hudes, G.R., Uzzo, R.G., Litwin, S., Dulaimi, E., Al-Saleem, T., and Campbell, K.S. (2014). PD-1 expression on peripheral blood cells increases with stage in renal cell carcinoma patients and is rapidly reduced after surgical tumor resection. *Cancer Immunol Res* 2, 320–331.
- Madouri, F., Guillou, N., Fauconnier, L., Marchiol, T., Rouxel, N., Chenuet, P., Ledru, A., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Chamaillard, M., et al. (2015). Caspase-1 activation by NLRP3 inflammasome dampens IL-33-dependent house dust mite-induced allergic lung inflammation. *J Mol Cell Biol* 7, 351–365.
- Mager, L.F., Riether, C., Schürch, C.M., Banz, Y., Wasmer, M.-H., Stuber, R., Theocharides, A.P., Li, X., Xia, Y., Saito, H., et al. (2015). IL-33 signaling contributes to the pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *J Clin Invest* 125, 2579–2591.
- Maghazachi, A.A., and Al-aoukaty, A. (1998). Chemokines activate natural killer cells through heterotrimeric G-proteins: implications for the treatment of AIDS and cancer. *The FASEB Journal* 12, 913–924.
- Mahmutovic Persson, I., Menzel, M., Ramu, S., Cerps, S., Akbarshahi, H., and Uller, L. (2018). IL-1 β mediates lung neutrophilia and IL-33 expression in a mouse model of viral-induced asthma exacerbation. *Respiratory Research* 19, 16.
- Mailliard, R.B., Alber, S.M., Shen, H., Watkins, S.C., Kirkwood, J.M., Herberman, R.B., and Kalinski, P. (2005). IL-18-induced CD83+CCR7+ NK helper cells. *J. Exp. Med.* 202, 941–953.
- 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.
- 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.
- Manetti, M., Ibba-Manneschi, L., Liakouli, V., Guiducci, S., Milia, A.F., Benelli, G., Marrelli, A., Conforti, M.L., Romano, E., Giacomelli, R., et al. (2010). The IL1-like cytokine IL33 and its receptor ST2 are abnormally expressed in the affected skin and visceral organs of patients with systemic sclerosis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 69, 598–605.
- Mankā, A., Buhé, V., Hammadi, M., Youinou, P., Ghedira, I., Berthou, C., and Bordron, A. (2009). Improvement of rituximab efficiency in chronic lymphocytic leukemia by CpG-mediated upregulation of CD20 expression independently of PU.1. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1173, 721–728.
- Mao, C., Fu, X.-H., Yuan, J.-Q., Yang, Z.-Y., Huang, Y.-F., Ye, Q.-L., Wu, X.-Y., Hu, X.-F., Zhai, Z.-M., and Tang, J.-L. (2015). Interleukin-2 as maintenance therapy for children and adults with acute myeloid leukaemia in first complete remission. *Cochrane Database Syst Rev* CD010248.
- Marcenaro, E., Ferranti, B., Falco, M., Moretta, L., and Moretta, A. (2008). Human NK cells directly recognize *Mycobacterium bovis* via TLR2 and acquire the ability to kill monocyte-derived DC. *Int. Immunol.* 20, 1155–1167.
- 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.
- Marie-Cardine, A., Viaud, N., Thonnart, N., Joly, R., Chanteux, S., Gauthier, L., Bonnafous, C., Rossi, B., Bléry, M., Paturel, C., et al. (2014). IPH4102, a humanized KIR3DL2 antibody with potent activity against cutaneous T-cell lymphoma. *Cancer Res.* 74, 6060–6070.

- Mårlind, J., Kaspar, M., Trachsel, E., Sommariva, R., Hindle, S., Bacci, C., Giovannoni, L., and Neri, D. (2008). Antibody-mediated delivery of interleukin-2 to the stroma of breast cancer strongly enhances the potency of chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* *14*, 6515–6524.
- Maroof, A., Beattie, L., Zubairi, S., Svensson, M., Stager, S., and Kaye, P.M. (2008). Posttranscriptional Regulation of IL10 Gene Expression Allows Natural Killer Cells to Express Immunoregulatory Function. *Immunity* *29*, 295–305.
- Marquardt, N., Wilk, E., Pokoyski, C., Schmidt, R.E., and Jacobs, R. (2010). Murine CXCR3+CD27bright NK cells resemble the human CD56bright NK-cell population. *Eur. J. Immunol.* *40*, 1428–1439.
- Martinez, J., Huang, X., and Yang, Y. (2008). Direct action of type I IFN on NK cells is required for their activation in response to vaccinia viral infection in vivo. *J. Immunol.* *180*, 1592–1597.
- Martínez-López, M., Iborra, S., Conde-Garrosa, R., and Sancho, D. (2015). Batf3-dependent CD103+ dendritic cells are major producers of IL-12 that drive local Th1 immunity against *Leishmania* major infection in mice. *Eur. J. Immunol.* *45*, 119–129.
- Martín-Fontecha, A., Thomsen, L.L., Brett, S., Gerard, C., Lipp, M., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2004). Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN- γ for T(H)1 priming. *Nat. Immunol.* *5*, 1260–1265.
- Marvie, P., Lisbonne, M., L'helgoualc'h, A., Rauch, M., Turlin, B., Preisser, L., Bourd-Boittin, K., Théret, N., Gascan, H., Piquet-Pellorce, C., et al. (2010). Interleukin-33 overexpression is associated with liver fibrosis in mice and humans. *J. Cell. Mol. Med.* *14*, 1726–1739.
- Masamune, A., Watanabe, T., Kikuta, K., Satoh, K., Kanno, A., and Shimosegawa, T. (2010). Nuclear expression of interleukin-33 in pancreatic stellate cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *299*, G821–832.
- Mashayekhi, M., Sandau, M.M., Dunay, I.R., Frickel, E.M., Khan, A., Goldszmid, R.S., Sher, A., Ploegh, H.L., Murphy, T.L., Sibley, L.D., et al. (2011). CD8 α (+) dendritic cells are the critical source of interleukin-12 that controls acute infection by *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Immunity* *35*, 249–259.
- Matsui, M., Kishida, T., Nakano, H., Yoshimoto, K., Shin-Ya, M., Shimada, T., Nakai, S., Imanishi, J., Yoshimoto, T., Hisa, Y., et al. (2009). Interleukin-27 activates natural killer cells and suppresses NK-resistant head and neck squamous cell carcinoma through inducing antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Cancer Res.* *69*, 2523–2530.
- Matsuyama, Y., Okazaki, H., Tamemoto, H., Kimura, H., Kamata, Y., Nagatani, K., Nagashima, T., Hayakawa, M., Iwamoto, M., Yoshio, T., et al. (2010). Increased levels of interleukin 33 in sera and synovial fluid from patients with active rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* *37*, 18–25.
- Matta, B.M., and Turnquist, H.R. (2016). Expansion of Regulatory T Cells In Vitro and In Vivo by IL-33. *Methods Mol. Biol.* *1371*, 29–41.
- Matta, B.M., Lott, J.M., Mathews, L.R., Liu, Q., Rosborough, B.R., Blazar, B.R., and Turnquist, H.R. (2014). IL-33 Is an Unconventional Alarmin That Stimulates IL-2 Secretion by Dendritic Cells To Selectively Expand IL-33R/ST2+ Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology* *193*, 4010–4020.
- Maurer, S., Kropp, K.N., Klein, G., Steinle, A., Haen, S.P., Walz, J.S., Hinterleitner, C., Märklin, M., Kopp, H.-G., and Salih, H.R. (2018). Platelet-mediated shedding of NKG2D ligands impairs NK cell immune-surveillance of tumor cells. *Oncoimmunology* *7*, e1364827.
- Mavropoulos, A., Sully, G., Cope, A.P., and Clark, A.R. (2005). Stabilization of IFN- γ mRNA by MAPK p38 in IL-12- and IL-18-stimulated human NK cells. *Blood* *105*, 282–288.
- Mayuzumi, N., Matsushima, H., and Takashima, A. (2009). IL-33 promotes DC development in BM culture by triggering GM-CSF production. *Eur. J. Immunol.* *39*, 3331–3342.
- Maywald, R.L., Doerner, S.K., Pastorelli, L., De Salvo, C., Benton, S.M., Dawson, E.P., Lanza, D.G., Berger, N.A., Markowitz, S.D., Lenz, H.-J., et al. (2015). IL-33 activates tumor stroma to promote intestinal polyposis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *112*, E2487–2496.
- 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.
- McIntyre, K.W., and Welsh, R.M. (1986). Accumulation of natural killer and cytotoxic T large granular lymphocytes in the liver during virus infection. *J. Exp. Med.* *164*, 1667–1681.
- McKenna, D.H., Sumstad, D., Bostrom, N., Kadidlo, D.M., Fautsch, S., McNearney, S., Dewaard, R., McGlave, P.B., Weisdorf, D.J., Wagner, J.E., et al. (2007). Good manufacturing practices production of natural killer cells for immunotherapy: a six-year single-institution experience. *Transfusion* *47*, 520–528.
- McMichael, E.L., Jaime-Ramirez, A.C., Guenterberg, K.D., Luedke, E., Atwal, L.S., Campbell, A.R., Hu, Z., Tatum, A.S., Kondadasula, S.V., Mo, X., et al. (2017). IL-21 enhances natural killer cell response to cetuximab-coated pancreatic tumor cells. *Clin Cancer Res* *23*, 489–502.

- McWilliams, E.M., Mele, J.M., Cheney, C., Timmerman, E.A., Fiazuddin, F., Strattan, E.J., Mo, X., Byrd, J.C., Muthusamy, N., and Awan, F.T. (2016). Therapeutic CD94/NKG2A blockade improves natural killer cell dysfunction in chronic lymphocytic leukemia. *Oncoimmunology* 5, e1226720.
- Medema, J.P., Scaffidi, C., Kischkel, F.C., Shevchenko, A., Mann, M., Krammer, P.H., and Peter, M.E. (1997). FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J.* 16, 2794–2804.
- Medvedev, A.E., Johnsen, A.-C., Haux, J., Steinkjer, B., Egeberg, K., Lynch, D.H., Sundan, A., and Espevik, T. (1997). REGULATION OF FAS AND FAS-LIGAND EXPRESSION IN NK CELLS BY CYTOKINES AND THE INVOLVEMENT OF FAS-LIGAND IN NK/LAK CELL-MEDIATED CYTOTOXICITY. *Cytokine* 9, 394–404.
- Meehansan, J., Tsuda, H., Komine, M., Tominaga, S.-I., and Ohtsuki, M. (2012a). Regulation of IL-33 expression by IFN- γ and tumor necrosis factor- α in normal human epidermal keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 132, 2593–2600.
- Meehansan, J., Komine, M., Tsuda, H., Tominaga, S.-I., and Ohtsuki, M. (2012b). Ultraviolet B irradiation induces the expression of IL-33 mRNA and protein in normal human epidermal keratinocytes. *J. Dermatol. Sci.* 65, 72–74.
- Meehansan, J., Komine, M., Tsuda, H., Karakawa, M., Tominaga, S., and Ohtsuki, M. (2013). Expression of IL-33 in the epidermis: The mechanism of induction by IL-17. *Journal of Dermatological Science* 71, 107–114.
- 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. *The Journal of Immunology* 160, 2637–2644.
- Ménard, C., Blay, J.-Y., Borg, C., Michiels, S., Ghiringhelli, F., Robert, C., Nonn, C., Chaput, N., Taïeb, J., Delahaye, N.F., et al. (2009). Natural Killer Cell IFN- γ Levels Predict Long-term Survival with Imatinib Mesylate Therapy in Gastrointestinal Stromal Tumor-Bearing Patients. *Cancer Res* 69, 3563–3569.
- Merino, A., Zhang, B., Dougherty, P., 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, 3770–3785.
- Mertz, K.D., Mager, L.F., Wasmer, M.-H., Thiesler, T., Koelzer, V.H., Ruzzante, G., Joller, S., Murdoch, J.R., Brümendorf, T., Genitsch, V., et al. (2016). The IL-33/ST2 pathway contributes to intestinal tumorigenesis in humans and mice. *Oncoimmunology* 5, e1062966.
- Messaoudene, M., Fregni, G., Fourmentaux-Neves, E., Chanal, J., Maubec, E., Mazouz-Dorval, S., Couturaud, B., Girod, A., Sastre-Garau, X., Albert, S., et al. (2014). Mature cytotoxic CD56(bright)/CD16(+) natural killer cells can infiltrate lymph nodes adjacent to metastatic melanoma. *Cancer Res.* 74, 81–92.
- Michaud, H.-A., Eliaou, J.-F., Lafont, V., Bonnefoy, N., and Gros, L. (2014). Tumor antigen-targeting monoclonal antibody-based immunotherapy: Orchestrating combined strategies for the development of long-term antitumor immunity. *Oncoimmunology* 3, e955684.
- Micheau, O., and Tschopp, J. (2003). Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 114, 181–190.
- Middleton, D., and Gonzelez, F. (2010). The extensive polymorphism of KIR genes. *Immunology* 129, 8–19.
- Mildner, M., Storka, A., Lichtenauer, M., Mlitz, V., Ghannadan, M., Hoetzenecker, K., Nickl, S., Dome, B., Tschachler, E., and Ankersmit, H.J. (2010). Primary sources and immunological prerequisites for sST2 secretion in humans. *Cardiovascular Research* 87, 769–777.
- Miller, J.S., and McCullar, V. (2001). Human natural killer cells with polyclonal lectin and immunoglobulinlike receptors develop from single hematopoietic stem cells with preferential expression of NKG2A and KIR2DL2/L3/S2. *Blood* 98, 705–713.
- Miller, A.M., Xu, D., Asquith, D.L., Denby, L., Li, Y., Sattar, N., Baker, A.H., McInnes, I.B., and Liew, F.Y. (2008). IL-33 reduces the development of atherosclerosis. *J. Exp. Med.* 205, 339–346.
- Miller, J.S., Oelkers, S., Verfaillie, C., and McGlave, P. (1992). Role of monocytes in the expansion of human activated natural killer cells. *Blood* 80, 2221–2229.
- Miller, J.S., Soignier, Y., Panoskaltsis-Mortari, A., McNearney, S.A., Yun, G.H., Fautsch, S.K., McKenna, D., Le, C., Defor, T.E., Burns, L.J., et al. (2005). Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. *Blood* 105, 3051–3057.
- Minagawa, M., Watanabe, H., Miyaji, C., Tomiyama, K., Shimura, H., Ito, A., Ito, M., Domen, J., Weissman, I.L., and Kawai, K. (2002). Enforced expression of Bcl-2 restores the number of NK cells, but does not rescue the impaired development of NKT cells or intraepithelial lymphocytes, in IL-2/IL-15 receptor beta-chain-deficient mice. *J. Immunol.* 169, 4153–4160.
- Miscia, S., Marchisio, M., Grilli, A., Di Valerio, V., Centurione, L., Sabatino, G., Garaci, F., Zauli, G., Bonvini, E., and Di Baldassarre, A. (2002). Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) activates Jak1/Stat3-Stat5B signaling through TNFR-1 in human B cells. *Cell Growth Differ.* 13, 13–18.

- Mishra, R., Polic, B., Welsh, R.M., and Szomolanyi-Tsuda, E. (2013). Inflammatory cytokine-mediated evasion of virus-induced tumors from NK cell control. *J. Immunol.* *191*, 961–970.
- Mitsui, A., Tada, Y., Takahashi, T., Shibata, S., Kamata, M., Miyagaki, T., Fujita, H., Sugaya, M., Kadono, T., Sato, S., et al. (2016). Serum IL-33 levels are increased in patients with psoriasis. *Clin. Exp. Dermatol.* *41*, 183–189.
- Mittal, D., Vijayan, D., Putz, E.M., Aguilera, A.R., Markey, K.A., Straube, J., Kazakoff, S., Nutt, S.L., Takeda, K., Hill, G.R., et al. (2017). Interleukin-12 from CD103+ Batf3-Dependent Dendritic Cells Required for NK-Cell Suppression of Metastasis. *Cancer Immunol Res* *5*, 1098–1108.
- Miyagi, T., Gil, M.P., Wang, X., Louten, J., Chu, W.-M., and Biron, C.A. (2007). High basal STAT4 balanced by STAT1 induction to control type 1 interferon effects in natural killer cells. *J. Exp. Med.* *204*, 2383–2396.
- Mocikat, R., Braumüller, H., Gumy, A., Egeter, O., Ziegler, H., Reusch, U., Bubeck, A., Louis, J., Mailhammer, R., Riethmüller, G., et al. (2003). Natural killer cells activated by MHC class I(low) targets prime dendritic cells to induce protective CD8 T cell responses. *Immunity* *19*, 561–569.
- Moffett, A., and Loke, C. (2006). Immunology of placentation in eutherian mammals. *Nat. Rev. Immunol.* *6*, 584–594.
- Moga, E., Alvarez, E., Cantó, E., Vidal, S., Rodríguez-Sánchez, J.L., Sierra, J., and Briones, J. (2008). NK cells stimulated with IL-15 or CpG ODN enhance rituximab-dependent cellular cytotoxicity against B-cell lymphoma. *Exp. Hematol.* *36*, 69–77.
- Moir, S., and Fauci, A.S. (2014). B-cell exhaustion in HIV infection: the role of immune activation. *Curr Opin HIV AIDS* *9*, 472–477.
- Mok, M.Y., Huang, F.P., Ip, W.K., Lo, Y., Wong, F.Y., Chan, E.Y.T., Lam, K.F., and Xu, D. (2010). Serum levels of IL-33 and soluble ST2 and their association with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* *49*, 520–527.
- 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-tumor and anti-viral activity. *Nature* *551*, 110–114.
- Molofsky, A.B., Van Gool, F., Liang, H.-E., Van Dyken, S.J., Nussbaum, J.C., Lee, J., Bluestone, J.A., and Locksley, R.M. (2015). Interleukin-33 and Interferon- γ Counter-Regulate Group 2 Innate Lymphoid Cell Activation during Immune Perturbation. *Immunity* *43*, 161–174.
- Monnet, C., Jorieux, S., Souyris, N., Zaki, O., Jacquet, A., Fournier, N., Crozet, F., de Romeuf, C., Bouayadi, K., Urbain, R., et al. (2014). Combined glyco- and protein-Fc engineering simultaneously enhance cytotoxicity and half-life of a therapeutic antibody. *MAbs* *6*, 422–436.
- Monticelli, L.A., Sonnenberg, G.F., Abt, M.C., Alenghat, T., Ziegler, C.G.K., Doering, T.A., Angelosanto, J.M., Laidlaw, B.J., Yang, C.Y., Sathaliyawala, T., et al. (2011). Innate lymphoid cells promote lung-tissue homeostasis after infection with influenza virus. *Nat. Immunol.* *12*, 1045–1054.
- Moral, J.A., Leung, J., Rojas, L.A., Ruan, J., Zhao, J., Sethna, Z., Ramnarain, A., Gasmí, B., Gururajan, M., Redmond, D., et al. (2020). ILC2s amplify PD-1 blockade by activating tissue-specific cancer immunity. *Nature* *579*, 130–135.
- Morandi, B., Bougras, G., Muller, W.A., Ferlazzo, G., and Münz, C. (2006). NK cells of human secondary lymphoid tissues enhance T cell polarization via IFN- γ secretion. *Eur. J. Immunol.* *36*, 2394–2400.
- Morandi, B., Mortara, L., Chiossone, L., Accolla, R.S., Mingari, M.C., Moretta, L., Moretta, A., and Ferlazzo, G. (2012). Dendritic Cell Editing by Activated Natural Killer Cells Results in a More Protective Cancer-Specific Immune Response. *PLoS One* *7*.
- Morel, P.A., Ernst, L.K., and Metes, D. (1999). Functional CD32 molecules on human NK cells. *Leuk. Lymphoma* *35*, 47–56.
- Moretta, A., Sivori, S., Vitale, M., Pende, D., Morelli, L., Augugliaro, R., Bottino, C., and Moretta, L. (1995). Existence of both inhibitory (p58) and activatory (p50) receptors for HLA-C molecules in human natural killer cells. *J. Exp. Med.* *182*, 875–884.
- Moretta, L., Biassoni, R., Bottino, C., Cantoni, C., Pende, D., Mingari, M.C., and Moretta, A. (2002). Human NK cells and their receptors. *Microbes and Infection* *4*, 1539–1544.
- Moretta, L., Ferlazzo, G., Bottino, C., Vitale, M., Pende, D., Mingari, M.C., and Moretta, A. (2006). Effector and regulatory events during natural killer-dendritic cell interactions. *Immunol. Rev.* *214*, 219–228.
- Morita, H., Arae, K., Unno, H., Miyauchi, K., Toyama, S., Nambu, A., Oboki, K., Ohno, T., Motomura, K., Matsuda, A., et al. (2015). An Interleukin-33-Mast Cell-Interleukin-2 Axis Suppresses Papain-Induced Allergic Inflammation by Promoting Regulatory T Cell Numbers. *Immunity* *43*, 175–186.
- Moritz, D.R., Rodewald, H.R., Gheyselinck, J., and Klemenz, R. (1998). The IL-1 receptor-related T1 antigen is expressed on immature and mature mast cells and on fetal blood mast cell progenitors. *J. Immunol.* *161*, 4866–4874.
- Moro, K., Yamada, T., Tanabe, M., Takeuchi, T., Ikawa, T., Kawamoto, H., Furusawa, J., Ohtani, M., Fujii, H., and Koyasu, S. (2010). Innate production of T H 2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit + Sca-1 + lymphoid cells. *Nature* *463*, 540–544.

- Mortier, E., Quémener, A., Vusio, P., Lorenzen, I., Boublik, Y., Grötzinger, J., Plet, A., and Jacques, Y. (2006). Soluble interleukin-15 receptor alpha (IL-15R α)-sushi as a selective and potent agonist of IL-15 action through IL-15R β / γ . *Hyperagonist IL-15 x IL-15R α fusion proteins*. *J. Biol. Chem.* *281*, 1612–1619.
- Moulin, D., Donzé, O., Talabot-Ayer, D., Mézin, F., Palmer, G., and Gabay, C. (2007). Interleukin (IL)-33 induces the release of pro-inflammatory mediators by mast cells. *Cytokine* *40*, 216–225.
- Moussion, C., Ortega, N., and Girard, J.-P. (2008). The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel “alarmin”? *PLoS ONE* *3*, e3331.
- Mrózek, E., Anderson, P., and Caligiuri, M.A. (1996). Role of interleukin-15 in the development of human CD56+ natural killer cells from CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood* *87*, 2632–2640.
- Müller, N., Michen, S., Tietze, S., Töpfer, K., Schulte, A., Lamszus, K., Schmitz, M., Schackert, G., Pastan, I., and Temme, A. (2015). Engineering NK cells modified with an EGFRvIII-specific chimeric antigen receptor to overexpress CXCR4 improves immunotherapy of CXCL12/SDF-1 α -secreting glioblastoma. *J Immunother* *38*, 197–210.
- Muller-Berghaus, J., Olson, W.C., Moulton, R.A., Knapp, W.T., Schadendorf, D., and Storkus, W.J. (2005). IL-12 Production by Human Monocyte-Derived Dendritic Cells: Looking at the Single Cell. *Journal of Immunotherapy* *28*, 306–313.
- Murakami, T., Nakazawa, T., Natsume, A., Nishimura, F., Nakamura, M., Matsuda, R., Omoto, K., Tanaka, Y., Shida, Y., Park, Y.-S., et al. (2018). Novel Human NK Cell Line Carrying CAR Targeting EGFRvIII Induces Antitumor Effects in Glioblastoma Cells. *Anticancer Res.* *38*, 5049–5056.
- Murphy, K.M., Ouyang, W., Farrar, J.D., Yang, J., Ranganath, S., Asnagli, H., Afkarian, M., and Murphy, T.L. (2000). Signaling and transcription in T helper development. *Annu. Rev. Immunol.* *18*, 451–494.
- Mustjoki, S., Ekblom, M., Arstila, T.P., Dybedal, I., Epling-Burnette, P.K., Guilhot, F., Hjorth-Hansen, H., Höglund, M., Kovanen, P., Laurinoli, T., et al. (2009). Clonal expansion of T/NK-cells during tyrosine kinase inhibitor dasatinib therapy. *Leukemia* *23*, 1398–1405.
- Nabekura, T., Girard, J.-P., and Lanier, L.L. (2015). IL-33 receptor ST2 amplifies the expansion of NK cells and enhances host defense during mouse cytomegalovirus infection. *J. Immunol.* *194*, 5948–5952.
- Nagler, A., Lanier, L.L., and Phillips, J.H. (1988). The effects of IL-4 on human natural killer cells. A potent regulator of IL-2 activation and proliferation. *J. Immunol.* *141*, 2349–2351.
- Nagler, A., Lanier, L.L., Cwirla, S., and Phillips, J.H. (1989). Comparative studies of human FcR111-positive and negative natural killer cells. *J. Immunol.* *143*, 3183–3191.
- Nakahira, M., Ahn, H.-J., Park, W.-R., Gao, P., Tomura, M., Park, C.-S., Hamaoka, T., Ohta, T., Kurimoto, M., and Fujiwara, H. (2002). Synergy of IL-12 and IL-18 for IFN- γ Gene Expression: IL-12-Induced STAT4 Contributes to IFN- γ Promoter Activation by Up-Regulating the Binding Activity of IL-18-Induced Activator Protein 1. *J Immunol* *168*, 1146–1153.
- Nakayama, M., Akiba, H., Takeda, K., Kojima, Y., Hashiguchi, M., Azuma, M., Yagita, H., and Okumura, K. (2009). Tim-3 mediates phagocytosis of apoptotic cells and cross-presentation. *Blood* *113*, 3821–3830.
- Nam, J.-S., Terabe, M., Mamura, M., Kang, M.-J., Chae, H., Stuelten, C., Kohn, E., Tang, B., Sabzevari, H., Anver, M.R., et al. (2008). An anti-TGF- β antibody suppresses metastasis via cooperative effects on multiple cell compartments. *Cancer Res* *68*, 3835–3843.
- Narni-Mancinelli, E., Gauthier, L., Baratin, M., Guia, S., Fenis, A., Deghmane, A.-E., Rossi, B., Fourquet, P., Escalière, B., Kerdiles, Y.M., et al. (2017). Complement factor P is a ligand for the natural killer cell-activating receptor Nkp46. *Sci Immunol* *2*.
- Nascimento, D.C., Melo, P.H., Piñeros, A.R., Ferreira, R.G., Colón, D.F., Donate, P.B., Castanheira, F.V., Gozzi, A., Czaikoski, P.G., Niedbala, W., et al. (2017). IL-33 contributes to sepsis-induced long-term immunosuppression by expanding the regulatory T cell population. *Nat Commun* *8*, 14919.
- Neill, D.R., Wong, S.H., Bellosi, A., Flynn, R.J., Daly, M., Langford, T.K.A., Bucks, C., Kane, C.M., Fallon, P.G., Pannell, R., et al. (2010). Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. *Nature* *464*, 1367–1370.
- Neo, S.Y., Yang, Y., Record, J., Ma, R., Chen, X., Chen, Z., Tobin, N.P., Blake, E., Seitz, C., Thomas, R., et al. (2020). CD73 immune checkpoint defines regulatory NK cells within the tumor microenvironment. *J Clin Invest* *130*, 1185–1198.
- Netter, P., Anft, M., and Watzl, C. (2017). Termination of the Activating NK Cell Immunological Synapse Is an Active and Regulated Process. *J. Immunol.* *199*, 2528–2535.
- Neurath, M.F. (2019). IL-23 in inflammatory bowel diseases and colon cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews* *45*, 1–8.

- Newport, M.J., Huxley, C.M., Huston, S., Hawrylowicz, C.M., Oostra, B.A., Williamson, R., and Levin, M. (1996). A mutation in the interferon-gamma-receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection. *N. Engl. J. Med.* *335*, 1941–1949.
- Nguyen, K.B., Cousens, L.P., Doughty, L.A., Pien, G.C., Durbin, J.E., and Biron, C.A. (2000). Interferon alpha/beta-mediated inhibition and promotion of interferon gamma: STAT1 resolves a paradox. *Nat. Immunol.* *1*, 70–76.
- Nguyen, K.B., Salazar-Mather, T.P., Dalod, M.Y., Van Deusen, J.B., Wei, X., Liew, F.Y., Caligiuri, M.A., Durbin, J.E., and Biron, C.A. (2002). Coordinated and distinct roles for IFN-alpha beta, IL-12, and IL-15 regulation of NK cell responses to viral infection. *J. Immunol.* *169*, 4279–4287.
- Ni, Y., Tao, L., Chen, C., Song, H., Li, Z., Gao, Y., Nie, J., Piccioni, M., Shi, G., and Li, B. (2015). The Deubiquitinase USP17 Regulates the Stability and Nuclear Function of IL-33. *Int J Mol Sci* *16*, 27956–27966.
- Nicolai, C.J., Wolf, N., Chang, I.-C., Kirn, G., Marcus, A., Nduvaku, C.O., McWhirter, S.M., and Raulet, D.H. (2020). NK cells mediate clearance of CD8+ T cell-resistant tumors in response to STING agonists. *Sci Immunol* *5*.
- Nicoll, G., Ni, J., Liu, D., Klenerman, P., Munday, J., Dubock, S., Mattei, M.G., and Crocker, P.R. (1999). Identification and characterization of a novel siglec, siglec-7, expressed by human natural killer cells and monocytes. *J. Biol. Chem.* *274*, 34089–34095.
- Nile, C.J., Barksby, E., Jitprasertwong, P., Preshaw, P.M., and Taylor, J.J. (2010). Expression and regulation of interleukin-33 in human monocytes. *Immunology* *130*, 172–180.
- Nishida, A., Andoh, A., Imaeda, H., Inatomi, O., Shiomi, H., and Fujiyama, Y. (2010). Expression of interleukin 1-like cytokine interleukin 33 and its receptor complex (ST2L and IL1RACp) in human pancreatic myofibroblasts. *Gut* *59*, 531–541.
- Niu, C., Jin, H., Li, M., Zhu, S., Zhou, L., Jin, F., Zhou, Y., Xu, D., Xu, J., Zhao, L., et al. (2017). Low-dose bortezomib increases the expression of NKG2D and DNAM-1 ligands and enhances induced NK and $\gamma\delta$ T cell-mediated lysis in multiple myeloma. *Oncotarget* *8*, 5954–5964.
- Nizzoli, G., Krietsch, J., Weick, A., Steinfeldler, S., Facciotti, F., Gruarin, P., Bianco, A., Steckel, B., Moro, M., Crosti, M., et al. (2013). Human CD1c+ dendritic cells secrete high levels of IL-12 and potently prime cytotoxic T-cell responses. *Blood* *122*, 932–942.
- Nomura, K., Kojima, T., Fuchimoto, J., Obata, K., Keira, T., Himi, T., and Sawada, N. (2012). Regulation of interleukin-33 and thymic stromal lymphopoietin in human nasal fibroblasts by proinflammatory cytokines. *Laryngoscope* *122*, 1185–1192.
- 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.
- 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.
- Obata-Onai, A., Hashimoto, S., Onai, N., Kurachi, M., Nagai, S., Shizuno, K., Nagahata, T., and Matsushima, K. (2002). Comprehensive gene expression analysis of human NK cells and CD8+ T lymphocytes. *Int Immunol* *14*, 1085–1098.
- Oberg, L., Johansson, S., Michaëlsson, J., Tomasello, E., Vivier, E., Kärre, K., and Höglund, P. (2004). Loss or mismatch of MHC class I is sufficient to trigger NK cell-mediated rejection of resting lymphocytes in vivo - role of KARAP/DAP12-dependent and -independent pathways. *Eur. J. Immunol.* *34*, 1646–1653.
- Ochayon, D.E., Ali, A., Alarcon, P.C., Krishnamurthy, D., Kottyan, L.C., Borchers, M.T., and Waggoner, S.N. (2020). IL-33 promotes type 1 cytokine expression via p38 MAPK in human NK cells. *J. Leukoc. Biol.*
- O'Donnell, C., Mahmoud, A., Keane, J., Murphy, C., White, D., Carey, S., O'Riordain, M., Bennett, M.W., Brint, E., and Houston, A. (2016). An antitumorigenic role for the IL-33 receptor, ST2L, in colon cancer. *Br. J. Cancer* *114*, 37–43.
- Oelsner, S., Friede, M.E., Zhang, C., Wagner, J., Badura, S., Bader, P., Ullrich, E., Ottmann, O.G., Klingemann, H., Tonn, T., et al. (2017). Continuously expanding CAR NK-92 cells display selective cytotoxicity against B-cell leukemia and lymphoma. *Cytotherapy* *19*, 235–249.
- Oelsner, S., Waldmann, A., Billmeier, A., Röder, J., Lindner, A., Ullrich, E., Marschalek, R., Dotti, G., Jung, G., Große-Hovest, L., et al. (2019). Genetically engineered CAR NK cells display selective cytotoxicity against FLT3-positive B-ALL and inhibit in vivo leukemia growth. *Int. J. Cancer* *145*, 1935–1945.
- Ogasawara, K., Yoshinaga, S.K., and Lanier, L.L. (2002). Inducible costimulator costimulates cytotoxic activity and IFN-gamma production in activated murine NK cells. *J. Immunol.* *169*, 3676–3685.
- Ohno, T., Oboki, K., Kajiwara, N., Morii, E., Aozasa, K., Flavell, R.A., Okumura, K., Saito, H., and Nakae, S. (2009). Caspase-1, caspase-8, and calpain are dispensable for IL-33 release by macrophages. *J. Immunol.* *183*, 7890–7897.

- Ohno, T., Oboki, K., Morita, H., Kajiwara, N., Arae, K., Tanaka, S., Ikeda, M., Iikura, M., Akiyama, T., Inoue, J., et al. (2011). Paracrine IL-33 stimulation enhances lipopolysaccharide-mediated macrophage activation. *PLoS ONE* 6, e18404.
- 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.
- Ohyashiki, K., Katagiri, S., Tauchi, T., Ohyashiki, J.H., Maeda, Y., Matsumura, I., and Kyo, T. (2012). Increased natural killer cells and decreased CD3(+)CD8(+)CD62L(+) T cells in CML patients who sustained complete molecular remission after discontinuation of imatinib. *Br. J. Haematol.* 157, 254–256.
- Oikonomou, E., Kothonidis, K., Taoufik, E., Probert, E., Zografos, G., Nasioulas, G., Andera, L., and Pintzas, A. (2007). Newly established tumorigenic primary human colon cancer cell lines are sensitive to TRAIL-induced apoptosis in vitro and in vivo. *Br. J. Cancer* 97, 73–84.
- Okamura, H., Tsutsi, H., Komatsu, T., Yutsudo, M., Hakura, A., Tanimoto, T., Torigoe, K., Okura, T., Nukada, Y., and Hattori, K. (1995). Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature* 378, 88–91.
- Okamura, H., Kashiwamura, S., Tsutsui, H., Yoshimoto, T., and Nakanishi, K. (1998). Regulation of interferon- γ production by IL-12 and IL-18. *Current Opinion in Immunology* 10, 259–264.
- Oliva, A., Kinter, A.L., Vaccarezza, M., Rubbert, A., Catanzaro, A., Moir, S., Monaco, J., Ehler, L., Mizell, S., Jackson, R., et al. (1998). Natural killer cells from human immunodeficiency virus (HIV)-infected individuals are an important source of CC-chemokines and suppress HIV-1 entry and replication in vitro. *J. Clin. Invest.* 102, 223–231.
- Omilusik, K.D., Best, J.A., Yu, B., Goossens, S., Weidemann, A., Nguyen, J.V., Seuntjens, E., Stryjewska, A., Zweier, C., Roychoudhuri, R., et al. (2015). Transcriptional repressor ZEB2 promotes terminal differentiation of CD8⁺ effector and memory T cell populations during infection. *J. Exp. Med.* 212, 2027–2039.
- Orange, J.S. (2013). Natural killer cell deficiency. *J Allergy Clin Immunol* 132, 515–526.
- Orange, J.S., and Biron, C.A. (1996). Characterization of early IL-12, IFN- α , and TNF effects on antiviral state and NK cell responses during murine cytomegalovirus infection. *J. Immunol.* 156, 4746–4756.
- Orange, J.S., Wang, B., Terhorst, C., and Biron, C.A. (1995). Requirement for natural killer cell-produced interferon gamma in defense against murine cytomegalovirus infection and enhancement of this defense pathway by interleukin 12 administration. *J. Exp. Med.* 182, 1045–1056.
- Orbelyan, G.A., Tang, F., Sally, B., Solus, J., Meresse, B., Ciszewski, C., Grenier, J.-C., Barreiro, L.B., Lanier, L.L., and Jabri, B. (2014). Human NKG2E is expressed and forms an intracytoplasmic complex with CD94 and DAP12. *J. Immunol.* 193, 610–616.
- Osborn, M., Soares, D.C., Vacca, F., Cohen, E.S., Scott, I.C., Gregory, W.F., Smyth, D.J., Toivakka, M., Kemter, A.M., le Bihan, T., et al. (2017). HpARI Protein Secreted by a Helminth Parasite Suppresses Interleukin-33. *Immunity* 47, 739-751.e5.
- Oshikawa, K., Yanagisawa, K., Tominaga, S. ichi, and Sugiyama, Y. (2002). ST2 protein induced by inflammatory stimuli can modulate acute lung inflammation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 299, 18–24.
- van Ostaijen-ten Dam, M.M., Prins, H.-J., Boerman, G.H., Vervat, C., Pende, D., Putter, H., Lankester, A., van Tol, M.J.D., Zwaginga, J.J., and Schilham, M.W. (2016). Preparation of Cytokine-activated NK Cells for Use in Adoptive Cell Therapy in Cancer Patients: Protocol Optimization and Therapeutic Potential. *J. Immunother.* 39, 90–100.
- Otegbeye, F., Ojo, E., Moreton, S., Mackowski, N., Lee, D.A., de Lima, M., and Wald, D.N. (2018). Inhibiting TGF- β signaling preserves the function of highly activated, in vitro expanded natural killer cells in AML and colon cancer models. *PLoS ONE* 13, e0191358.
- Palm, N.W., Rosenstein, R.K., Yu, S., Schenten, D.D., Florsheim, E., and Medzhitov, R. (2013). Bee Venom Phospholipase A2 Induces a Primary Type 2 Response that Is Dependent on the Receptor ST2 and Confers Protective Immunity. *Immunity* 39, 976–985.
- Palmer, G., and Gabay, C. (2011). Interleukin-33 biology with potential insights into human diseases. *Nature Reviews Rheumatology*.
- Palmer, G., Lipsky, B.P., Smithgall, M.D., Meininger, D., Siu, S., Talbot-Ayer, D., Gabay, C., and Smith, D.E. (2008). The IL-1 receptor accessory protein (AcP) is required for IL-33 signaling and soluble AcP enhances the ability of soluble ST2 to inhibit IL-33. *Cytokine* 42, 358–364.
- Palumbo, A., Hajek, R., Delforge, M., Kropff, M., Petrucci, M.T., Catalano, J., Gisslinger, H., Wiktor-Jędrzejczak, W., Zodelava, M., Weisel, K., et al. (2012). Continuous Lenalidomide Treatment for Newly Diagnosed Multiple Myeloma. *New England Journal of Medicine* 366, 1759–1769.
- Paolino, M., Choidas, A., Wallner, S., Pranjić, B., Uribealago, I., Loeser, S., Jamieson, A.M., Langdon, W.Y., Ikeda, F., Fededa, J.P., et al. (2014). The E3 ligase Cbl-b and TAM receptors regulate cancer metastasis via natural killer cells. *Nature* 507, 508–512.
- Parikka, M., Kainulainen, T., Tasanen, K., Väänänen, A., Bruckner-Tuderman, L., and Salo, T. (2003). Alterations of collagen XVII expression during transformation of oral epithelium to dysplasia and carcinoma. *J. Histochem. Cytochem.* 51, 921–929.

- Paris, G., Pozharskaya, T., Asempa, T., and Lane, A.P. (2014). Damage-associated molecular patterns stimulate interleukin-33 expression in nasal polyp epithelial cells. *International Forum of Allergy & Rhinology* 4, 15–21.
- Park, E.J., Kang, Y.J., Lee, H.K., Kim, H.S., Hong, J.T., Kim, Y., and Han, S.-B. (2019a). Role of CXCR3 in natural killer cell migration to melanoma cells. *The Journal of Immunology* 202, 51.17-51.17.
- Park, H.S., Cho, U., Im, S.Y., Yoo, C.Y., Jung, J.H., Suh, Y.J., and Choi, H.J. (2019b). 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.
- Park, S.-H., Kim, M.S., Lim, H.X., Cho, D., and Kim, T.S. (2017). IL-33-matured dendritic cells promote Th17 cell responses via IL-1 β and IL-6. *Cytokine* 99, 106–113.
- Parrish-Novak, J., Dillon, S.R., Nelson, A., Hammond, A., Sprecher, C., Gross, J.A., Johnston, J., Madden, K., Xu, W., West, J., et al. (2000). Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. *Nature* 408, 57–63.
- Parry, H.M., Stevens, T., Oldreive, C., Zadran, B., McSkeane, T., Rudzki, Z., Paneesha, S., Chadwick, C., Stankovic, T., Pratt, G., et al. (2016). NK cell function is markedly impaired in patients with chronic lymphocytic leukaemia but is preserved in patients with small lymphocytic lymphoma. *Oncotarget* 7, 68513–68526.
- Pascual-Reguant, A., Bayat Sarmadi, J., Baumann, C., Noster, R., Cirera-Salinas, D., Curato, C., Pelczar, P., Huber, S., Zielinski, C.E., Löhning, M., et al. (2017). TH17 cells express ST2 and are controlled by the alarmin IL-33 in the small intestine. *Mucosal Immunol* 10, 1431–1442.
- Passlick, B., Pantel, K., Kubuschok, B., Angstwurm, M., Neher, A., Thetter, O., Schweiberer, L., and Izbicki, J.R. (1996). Expression of MHC molecules and ICAM-1 on non-small cell lung carcinomas: Association with early lymphatic spread of tumour cells. *European Journal of Cancer* 32, 141–145.
- Pastille, E., Wasmer, M.-H., Adamczyk, A., Vu, V.P., Mager, L.F., Phuong, N.N.T., Palmieri, V., Simillion, C., Hansen, W., Kasper, S., et al. (2019). The IL-33/ST2 pathway shapes the regulatory T cell phenotype to promote intestinal cancer. *Mucosal Immunology* 12, 990–1003.
- Pastorelli, L., Garg, R.R., Hoang, S.B., Spina, L., Mattioli, B., Scarpa, M., Focchi, C., Vecchi, M., and Pizarro, T.T. (2010). Epithelial-derived IL-33 and its receptor ST2 are dysregulated in ulcerative colitis and in experimental Th1/Th2 driven enteritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 8017–8022.
- Pazina, T., James, A.M., IV, A.W.M., Bezman, N.A., Henning, K.A., Bee, C., Graziano, R.F., Robbins, M.D., Cohen, A.D., and Campbell, K.S. (2017). The anti-SLAMF7 antibody elotuzumab mediates NK cell activation through both CD16-dependent and -independent mechanisms. *Oncoimmunology* 6, e1339853.
- Pearce, E.L., Mullen, A.C., Martins, G.A., Krawczyk, C.M., Hutchins, A.S., Zediak, V.P., Banica, M., DiCioccio, C.B., Gross, D.A., Mao, C., et al. (2003). Control of Effector CD8+ T Cell Function by the Transcription Factor Eomesodermin. *Science* 302, 1041–1043.
- Pecaric-Petkovic, T., Didichenko, S.A., Kaempfer, S., Spiegl, N., and Dahinden, C.A. (2009). Human basophils and eosinophils are the direct target leukocytes of the novel IL-1 family member IL-33. *Blood* 113, 1526–1534.
- Pedretti, M., Verpelli, C., Mårlind, J., Bertani, G., Sala, C., Neri, D., and Bello, L. (2010). Combination of temozolomide with immunocytokine F16-IL2 for the treatment of glioblastoma. *Br. J. Cancer* 103, 827–836.
- 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.
- Peng, L., Zhang, J., Teng, Y., Zhao, Y., Wang, T., Mao, F., Lv, Y., Cheng, P., Li, W., Chen, N., et al. (2017). Tumor-Associated Monocytes/Macrophages Impair NK-Cell Function via TGF β 1 in Human Gastric Cancer. *Cancer Immunol Res* 5, 248–256.
- 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.
- Peppas, D., Gill, U.S., Reynolds, G., Easom, N.J.W., Pallett, L.J., Schurich, A., Micco, L., Nebbia, G., Singh, H.D., Adams, D.H., et al. (2013). Up-regulation of a death receptor renders antiviral T cells susceptible to NK cell-mediated deletion. *J Exp Med* 210, 99–114.
- Perales-Puchalt, A., Svoronos, N., Villarreal, D.O., Zankharia, U., Reuschel, E., Wojtak, K., Payne, K.K., Duperret, E.K., Muthumani, K., Conejo-Garcia, J.R., et al. (2019). IL-33 delays metastatic peritoneal cancer progression inducing an allergic microenvironment. *Oncoimmunology* 8, e1515058.
- Peritt, D., Robertson, S., Gri, G., Showe, L., Aste-Amezaga, M., and Trinchieri, G. (1998). Differentiation of human NK cells into NK1 and NK2 subsets. *J. Immunol.* 161, 5821–5824.

- Perona-Wright, G., Mohrs, K., Szaba, F.M., Kummer, L.W., Madan, R., Karp, C.L., Johnson, L.L., Smiley, S.T., and Mohrs, M. (2009). Systemic but not local infections elicit immunosuppressive IL-10 production by natural killer cells. *Cell Host Microbe* 6, 503–512.
- Perrot, I., Deauvieu, F., Massacrier, C., Hughes, N., Garrone, P., Durand, I., Demaria, O., Viaud, N., Gauthier, L., Blery, M., et al. (2010). TLR3 and Rig-like receptor on myeloid dendritic cells and Rig-like receptor on human NK cells are both mandatory for production of IFN-gamma in response to double-stranded RNA. *J. Immunol.* 185, 2080–2088.
- Pesce, S., Greppi, M., Tabellini, G., Rampinelli, F., Parolini, S., Olive, D., Moretta, L., Moretta, A., and Marcenaro, E. (2017). Identification of a subset of human natural killer cells expressing high levels of programmed death 1: A phenotypic and functional characterization. *J. Allergy Clin. Immunol.* 139, 335–346.e3.
- Peterson, M.E., and Long, E.O. (2008). Inhibitory receptor signaling via tyrosine phosphorylation of the adaptor Crk. *Immunity* 29, 578–588.
- Petitdemange, C., Becquart, P., Wauquier, N., Béziat, V., Debré, P., Leroy, E.M., and Vieillard, V. (2011). Unconventional repertoire profile is imprinted during acute chikungunya infection for natural killer cells polarization toward cytotoxicity. *PLoS Pathog.* 7, e1002268.
- Piccioli, D., Sbrana, S., Melandri, E., and Valiante, N.M. (2002). Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells. *J. Exp. Med.* 195, 335–341.
- Pichery, M., Mirey, E., Mercier, P., Lefrancais, E., Dujardin, A., Ortega, N., and Girard, J.-P. (2012). Endogenous IL-33 is highly expressed in mouse epithelial barrier tissues, lymphoid organs, brain, embryos, and inflamed tissues: in situ analysis using a novel Il-33-LacZ gene trap reporter strain. *J. Immunol.* 188, 3488–3495.
- Piehler, D., Grahnert, A., Eschke, M., Richter, T., Köhler, G., Stenzel, W., and Alber, G. (2013). T1/ST2 promotes T helper 2 cell activation and polyfunctionality in bronchopulmonary mycosis. *Mucosal Immunol* 6, 405–414.
- Pietra, G., Manzini, C., Rivara, S., Vitale, M., Cantoni, C., Petretto, A., Balsamo, M., Conte, R., Benelli, R., Minghelli, S., et al. (2012). Melanoma cells inhibit natural killer cell function by modulating the expression of activating receptors and cytolytic activity. *Cancer Res.* 72, 1407–1415.
- Pinz, K.G., Yakoboski, E., Jares, A., Liu, H., Firor, A.E., Chen, K.H., Wada, M., Salman, H., Tse, W., Hagag, N., et al. (2017). Targeting T-cell malignancies using anti-CD4 CAR NK-92 cells. *Oncotarget* 8, 112783–112796.
- Pipkin, M.E., and Lieberman, J. (2007). Delivering the kiss of death: progress on understanding how perforin works. *Current Opinion in Immunology* 19, 301–308.
- Platanias, L.C. (2005). Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 375–386.
- 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.
- Plitas, G., Konopacki, C., Wu, K., Bos, P.D., Morrow, M., Putintseva, E.V., Chudakov, D.M., and Rudensky, A.Y. (2016). Regulatory T Cells Exhibit Distinct Features in Human Breast Cancer. *Immunity* 45, 1122–1134.
- Pogge von Strandmann, E., Simhadri, V.R., von Tresckow, B., Sasse, S., Reiners, K.S., Hansen, H.P., Rothe, A., Böll, B., Simhadri, V.L., Borchmann, P., et al. (2007). Human leukocyte antigen-B-associated transcript 3 is released from tumor cells and engages the NKp30 receptor on natural killer cells. *Immunity* 27, 965–974.
- Poggi, A., Costa, P., Tomasello, E., and Moretta, L. (1998). IL-12-induced up-regulation of NKR1A expression in human NK cells and consequent NKR1A-mediated down-regulation of NK cell activation. *European Journal of Immunology* 28, 1611–1616.
- Poirot, L., Benoist, C., and Mathis, D. (2004). Natural killer cells distinguish innocuous and destructive forms of pancreatic islet autoimmunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 8102–8107.
- de Poot, S.A.H., and Bovenschen, N. (2014). Granzyme M: behind enemy lines. *Cell Death Differ* 21, 359–368.
- Prager, I., Liesche, C., van Ooijen, H., 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.
- Préfontaine, D., Nadigel, J., Chouiali, F., Audusseau, S., Semlali, A., Chakir, J., Martin, J.G., and Hamid, Q. (2010). Increased IL-33 expression by epithelial cells in bronchial asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, 752–754.
- Price, A.E., Liang, H.-E., Sullivan, B.M., Reinhardt, R.L., Eisley, C.J., Erle, D.J., and Locksley, R.M. (2010). Systemically dispersed innate IL-13-expressing cells in type 2 immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 11489–11494.
- Putz, E.M., Mayfosh, A.J., Kos, K., Barkauskas, D.S., Nakamura, K., Town, L., Goodall, K.J., Yee, D.Y., Poon, I.K., Baschuk, N., et al. (2017). NK cell heparanase controls tumor invasion and immune surveillance. *J. Clin. Invest.* 127, 2777–2788.

- Pyzik, M., Gendron-Pontbriand, E.-M., and Vidal, S.M. (2011). The Impact of Ly49-NK Cell-Dependent Recognition of MCMV Infection on Innate and Adaptive Immune Responses. *J Biomed Biotechnol* 2011.
- Qi, L., Zhang, Q., Miao, Y., Kang, W., Tian, Z., Xu, D., Xiao, W., and Fang, F. (2020a). Interleukin-33 activates and recruits natural killer cells to inhibit pulmonary metastatic cancer development. *Int. J. Cancer* 146, 1421–1434.
- Qi, L., Zhang, Q., Miao, Y., Kang, W., Tian, Z., Xu, D., Xiao, W., and Fang, F. (2020b). Interleukin-33 activates and recruits natural killer cells to inhibit pulmonary metastatic cancer development. *Int. J. Cancer* 146, 1421–1434.
- Qi, L., Zhang, Q., Miao, Y., Kang, W., Tian, Z., Xu, D., Xiao, W., and Fang, F. (2020c). Interleukin-33 activates and recruits natural killer cells to inhibit pulmonary metastatic cancer development. *International Journal of Cancer* 146, 1421–1434.
- Qin, L., Dominguez, D., Chen, S., Fan, J., Long, A., Zhang, M., Fang, D., Zhang, Y., Kuzel, T.M., and Zhang, B. (2016). Exogenous IL-33 overcomes T cell tolerance in murine acute myeloid leukemia. *Oncotarget* 7, 61069–61080.
- Quan, L.T., Tewari, M., O'Rourke, K., Dixit, V., Snipas, S.J., Poirier, G.G., Ray, C., Pickup, D.J., and Salvesen, G.S. (1996). Proteolytic activation of the cell death protease Yama/CPP32 by granzyme B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 1972–1976.
- Rabinovich, B.A., Li, J., Shannon, J., Hurren, R., Chalupny, J., Cosman, D., and Miller, R.G. (2003). Activated, but not resting, T cells can be recognized and killed by syngeneic NK cells. *J. Immunol.* 170, 3572–3576.
- Rabinowich, H., Sedlmayr, P., Herberman, R.B., and Whiteside, T.L. (1991). Increased proliferation, lytic activity, and purity of human natural killer cells cocultured with mitogen-activated feeder cells. *Cell. Immunol.* 135, 454–470.
- Raeiszadeh Jahromi, S., Mahesh, P.A., Jayaraj, B.S., Madhunapantula, S.R.V., Holla, A.D., Vishweswaraiah, S., and Ramachandra, N.B. (2014). Serum levels of IL-10, IL-17F and IL-33 in patients with asthma: a case-control study. *J Asthma* 51, 1004–1013.
- Rak, G.D., Osborne, L.C., Siracusa, M.C., Kim, B.S., Wang, K., Bayat, A., Artis, D., and Volk, S.W. (2016). IL-33-Dependent Group 2 Innate Lymphoid Cells Promote Cutaneous Wound Healing. *J. Invest. Dermatol.* 136, 487–496.
- Rank, M.A., Kobayashi, T., Kozaki, H., Bartemes, K.R., Squillace, D.L., and Kita, H. (2009). IL-33-activated dendritic cells induce an atypical TH2-type response. *J. Allergy Clin. Immunol.* 123, 1047–1054.
- Raulet, D.H., and Vance, R.E. (2006). Self-tolerance of natural killer cells. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 520–531.
- Rea, D., Dulphy, N., Henry, G., Ing, Guilhot, J., Guilhot, F., Nicolini, F.E., Legros, L., Rousselot, P., Mahon, F.-X., et al. (2013). Low Natural Killer (NK) Cell Counts and Functionality Are Associated With Molecular Relapse After Imatinib Discontinuation In Patients (pts) With Chronic Phase (CP)-Chronic Myeloid Leukemia (CML) With Undetectable BCR-ABL Transcripts For At Least 2 Years: Preliminary Results From Immunostim, On Behalf Of STIM Investigators. *Blood* 122, 856–856.
- Reddy, N., Hernandez-Ilizaliturri, F.J., Deeb, G., Roth, M., Vaughn, M., Knight, J., Wallace, P., and Czuczman, M.S. (2008). Immunomodulatory drugs stimulate natural killer-cell function, alter cytokine production by dendritic cells, and inhibit angiogenesis enhancing the anti-tumour activity of rituximab in vivo. *Br. J. Haematol.* 140, 36–45.
- Reichenbach, D.K., Schwarze, V., Matta, B.M., Tkachev, V., Lieberknecht, E., Liu, Q., Koehn, B.H., Pfeifer, D., Taylor, P.A., Prinz, G., et al. (2015). The IL-33/ST2 axis augments effector T-cell responses during acute GVHD. *Blood* 125, 3183–3192.
- Reiners, K.S., Topolar, D., Henke, A., Simhadri, V.R., Kessler, J., Sauer, M., Bessler, M., Hansen, H.P., Tawadros, S., Herling, M., et al. (2013). Soluble ligands for NK cell receptors promote evasion of chronic lymphocytic leukemia cells from NK cell anti-tumor activity. *Blood* 121, 3658–3665.
- Reynders, A., Yessaad, N., Vu Manh, T.-P., Dalod, M., Fenis, A., Aubry, C., Nikitas, G., Escalière, B., Renauld, J.C., Dussurget, O., et al. (2011). Identity, regulation and in vivo function of gut NKp46+RORγt+ and NKp46+RORγt- lymphoid cells. *EMBO J.* 30, 2934–2947.
- 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.
- 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.
- Rickard, J.A., O'Donnell, J.A., Evans, J.M., Lalaoui, N., Poh, A.R., Rogers, T., Vince, J.E., Lawlor, K.E., Ninnis, R.L., Anderton, H., et al. (2014). RIPK1 regulates RIPK3-MLKL-driven systemic inflammation and emergency hematopoiesis. *Cell* 157, 1175–1188.
- Robak, T., and Robak, E. (2011). New anti-CD20 monoclonal antibodies for the treatment of B-cell lymphoid malignancies. *BioDrugs* 25, 13–25.
- Robbins, S.H., Nguyen, K.B., Takahashi, N., Mikayama, T., Biron, C.A., and Brossay, L. (2002). Cutting Edge: Inhibitory Functions of the Killer Cell Lectin-Like Receptor G1 Molecule During the Activation of Mouse NK Cells. *The Journal of Immunology* 168, 2585–2589.

- Roberti, M.P., Barrio, M.M., Bravo, A.I., Rocca, Y.S., Arriaga, J.M., Bianchini, M., Mordoh, J., and Levy, E.M. (2011). IL-15 and IL-2 increase Cetuximab-mediated cellular cytotoxicity against triple negative breast cancer cell lines expressing EGFR. *Breast Cancer Res. Treat.* *130*, 465–475.
- 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.
- Roder, J.C., Haliotis, T., Klein, M., Korec, S., Jett, J.R., Ortaldo, J., Heberman, R.B., Katz, P., and Fauci, A.S. (1980). A new immunodeficiency disorder in humans involving NK cells. *Nature* *284*, 553–555.
- Roepman, P., Wessels, L.F.A., Kettelarij, N., Kemmeren, P., Miles, A.J., Lijnzaad, P., Tilanus, M.G.J., Koole, R., Hordijk, G.-J., van der Vliet, P.C., et al. (2005). An expression profile for diagnosis of lymph node metastases from primary head and neck squamous cell carcinomas. *Nat. Genet.* *37*, 182–186.
- Rölle, A., Pollmann, J., Ewen, E.-M., Le, V.T.K., Halenius, A., Hengel, H., and Cerwenka, A. (2014). IL-12-producing monocytes and HLA-E control HCMV-driven NKG2C+ NK cell expansion. *J. Clin. Invest.* *124*, 5305–5316.
- Romagnani, C., Juelke, K., Falco, M., Morandi, B., D’Agostino, A., Costa, R., Ratto, G., Forte, G., Carrega, P., Lui, G., et al. (2007). CD56brightCD16-killer Ig-like receptor- NK cells display longer telomeres and acquire features of CD56dim NK cells upon activation. *J. Immunol.* *178*, 4947–4955.
- Romagnani, P., De Paulis, A., Beltrame, C., Annunziato, F., Dente, V., Maggi, E., Romagnani, S., and Marone, G. (1999). Tryptase-chymase double-positive human mast cells express the eotaxin receptor CCR3 and are attracted by CCR3-binding chemokines. *Am. J. Pathol.* *155*, 1195–1204.
- 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.
- Romee, R., Schneider, S.E., Leong, J.W., Chase, J.M., Keppel, C.R., Sullivan, R.P., Cooper, M.A., and Fehniger, T.A. (2012). Cytokine activation induces human memory-like NK cells. *Blood* *120*, 4751–4760.
- Romee, R., Rosario, M., Berrien-Elliott, M.M., Wagner, J.A., Jewell, B.A., Schappe, T., Leong, J.W., Abdel-Latif, S., Schneider, S.E., Willey, S., et al. (2016). Cytokine-induced memory-like natural killer cells exhibit enhanced responses against myeloid leukemia. *Sci Transl Med* *8*, 357ra123.
- Rook, A.H., Kehrl, J.H., Wakefield, L.M., Roberts, A.B., Sporn, M.B., Burlington, D.B., Lane, H.C., and Fauci, A.S. (1986). Effects of transforming growth factor beta on the functions of natural killer cells: depressed cytolytic activity and blunting of interferon responsiveness. *J. Immunol.* *136*, 3916–3920.
- Rose, W.A., Okragly, A.J., Patel, C.N., and Benschop, R.J. (2015). IL-33 released by alum is responsible for early cytokine production and has adjuvant properties. *Sci Rep* *5*, 13146.
- Rosen, D.B., Bettadapura, J., Alsharifi, M., Mathew, P.A., Warren, H.S., and Lanier, L.L. (2005). Cutting edge: lectin-like transcript-1 is a ligand for the inhibitory human NKR-P1A receptor. *J. Immunol.* *175*, 7796–7799.
- Rosenberg, S.A. (2014). IL-2: The First Effective Immunotherapy for Human Cancer. *The Journal of Immunology* *192*, 5451–5458.
- Rosenberg, S.A., Lotze, M.T., Muul, L.M., Chang, A.E., Avis, F.P., Leitman, S., Linehan, W.M., Robertson, C.N., Lee, R.E., Rubin, J.T., et al. (1987). A Progress Report on the Treatment of 157 Patients with Advanced Cancer Using Lymphokine-Activated Killer Cells and Interleukin-2 or High-Dose Interleukin-2 Alone. *New England Journal of Medicine* *316*, 889–897.
- Ross, M.E., and Caligiuri, M.A. (1997). Cytokine-induced apoptosis of human natural killer cells identifies a novel mechanism to regulate the innate immune response. *Blood* *89*, 910–918.
- Rössle, M., Cathomas, G., Bonapace, L., Sachs, M., Dehler, S., Storz, M., Huber, G., Moch, H., Junt, T., and Mertz, K.D. (2016). Interleukin-33 Expression Indicates a Favorable Prognosis in Malignant Salivary Gland Tumors. *Int. J. Surg. Pathol.* *24*, 394–400.
- Rostan, O., Gangneux, J.-P., Piquet-Pellorce, C., Manuel, C., McKenzie, A.N.J., Guiguen, C., Samson, M., and Robert-Gangneux, F. (2013). The IL-33/ST2 axis is associated with human visceral leishmaniasis and suppresses Th1 responses in the livers of BALB/c mice infected with *Leishmania donovani*. *MBio* *4*, e00383-00313.
- Roussel, L., Erard, M., Cayrol, C., and Girard, J.-P. (2008). Molecular mimicry between IL-33 and KSHV for attachment to chromatin through the H2A-H2B acidic pocket. *EMBO Rep.* *9*, 1006–1012.
- Roy, A., Ganesh, G., Sippola, H., Bolin, S., Sawesi, O., Dagälv, A., Schlenner, S.M., Feyerabend, T., Rodewald, H.-R., Kjellén, L., et al. (2014). Mast Cell Chymase Degrades the Alarmins Heat Shock Protein 70, Biglycan, HMGB1, and Interleukin-33 (IL-33) and Limits Danger-induced Inflammation. *J. Biol. Chem.* *289*, 237–250.

- Roychoudhuri, R., Clever, D., Li, P., Wakabayashi, Y., Quinn, K.M., Klebanoff, C.A., Ji, Y., Sukumar, M., Eil, R.L., Yu, Z., et al. (2016). BACH2 regulates CD8(+) T cell differentiation by controlling access of AP-1 factors to enhancers. *Nat. Immunol.* *17*, 851–860.
- Ruan, J., Martin, P., Shah, B., Schuster, S.J., Smith, S.M., Furman, R.R., Christos, P., Rodriguez, A., Svoboda, J., Lewis, J., et al. (2015). Lenalidomide plus Rituximab as Initial Treatment for Mantle-Cell Lymphoma. *New England Journal of Medicine* *373*, 1835–1844.
- Rubinstein, M.P., Kovar, M., Purton, J.F., Cho, J.-H., Boyman, O., Surh, C.D., and Sprent, J. (2006). Converting IL-15 to a superagonist by binding to soluble IL-15R α . *PNAS* *103*, 9166–9171.
- Ruggeri, L., Capanni, M., Casucci, M., Volpi, I., Tosti, A., Perruccio, K., Urbani, E., Negrin, R.S., Martelli, M.F., and Velardi, A. (1999). Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* *94*, 333–339.
- 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.
- Rusakiewicz, S., Semeraro, M., Sarabi, M., Desbois, M., Locher, C., Mendez, R., Vimond, N., Concha, A., Garrido, F., Isambert, N., et al. (2013). Immune infiltrates are prognostic factors in localized gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res.* *73*, 3499–3510.
- Sabatino, G., Nicoletti, M., Neri, G., Saggini, A., Rosati, M., Conti, F., Cianchetti, E., Toniato, E., Fulcheri, M., Caraffa, A., et al. (2012). Impact of IL-9 and IL-33 in mast cells. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* *26*, 577–586.
- Safa, A.R. (2012). c-FLIP, A MASTER ANTI-APOPTOTIC REGULATOR. *Exp Oncol* *34*, 176–184.
- Saied, E.M., and El-Etreby, N.M. (2017). The role and prognostic value of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and interleukin-33 (IL-33) in serous and mucinous epithelial ovarian tumours. *Ann Diagn Pathol* *27*, 62–68.
- Salazar-Mather, T.P., Orange, J.S., and Biron, C.A. (1998). Early murine cytomegalovirus (MCMV) infection induces liver natural killer (NK) cell inflammation and protection through macrophage inflammatory protein 1 α (MIP-1 α)-dependent pathways. *J. Exp. Med.* *187*, 1–14.
- Salcedo, T.W., Kurosaki, T., Kanakaraj, P., Ravetch, J.V., and Perussia, B. (1993). Physical and functional association of p56lck with Fc gamma RIIIA (CD16) in natural killer cells. *J. Exp. Med.* *177*, 1475–1480.
- Salih, H.R., Rammensee, H.-G., and Steinle, A. (2002). Cutting edge: down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding. *J. Immunol.* *169*, 4098–4102.
- Sallusto, F., Mackay, C.R., and Lanzavecchia, A. (1997). Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells. *Science* *277*, 2005–2007.
- Salmond, R.J., Mirchandani, A.S., Besnard, A.-G., Bain, C.C., Thomson, N.C., and Liew, F.Y. (2012). IL-33 induces innate lymphoid cell-mediated airway inflammation by activating mammalian target of rapamycin. *J Allergy Clin Immunol* *130*, 1159–1166.e6.
- Saluja, R., Hawro, T., Eberle, J., Church, M.K., and Maurer, M. (2014). Interleukin-33 promotes the proliferation of mouse mast cells through ST2/MyD88 and p38 MAPK-dependent and Kit-independent pathways. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* *28*, 575–585.
- Sanada, S., Hakuno, D., Higgins, L.J., Schreiter, E.R., McKenzie, A.N.J., and Lee, R.T. (2007). IL-33 and ST2 comprise a critical biomechanically induced and cardioprotective signaling system. *J. Clin. Invest.* *117*, 1538–1549.
- Sanchez-Correa, B., Gayoso, I., Bergua, J.M., Casado, J.G., Morgado, S., Solana, R., and Tarazona, R. (2012). Decreased expression of DNAM-1 on NK cells from acute myeloid leukemia patients. *Immunol. Cell Biol.* *90*, 109–115.
- Sandel, M.H., Speetjens, F.M., Menon, A.G., Albertsson, P.A., Basse, P.H., Hokland, M., Nagelkerke, J.F., Tollenaar, R.A.E.M., Velde, C.J.H. van de, and Kuppen, P.J.K. (2005). Natural killer cells infiltrating colorectal cancer and MHC class I expression. *Molecular Immunology* *42*, 541–546.
- Sanderson, C.J. (1992). Interleukin-5, eosinophils, and disease. *Blood* *79*, 3101–3109.
- Saranchova, I., Han, J., Huang, H., Fenninger, F., Choi, K.B., Munro, L., Pfeifer, C., Welch, I., Wyatt, A.W., Fazli, L., et al. (2016). Discovery of a Metastatic Immune Escape Mechanism Initiated by the Loss of Expression of the Tumour Biomarker Interleukin-33. *Sci Rep* *6*, 30555.
- Sarkar, S., Germeraad, W.T.V., Rouschop, K.M.A., Steeghs, E.M.P., van Gelder, M., Bos, G.M.J., and Wieten, L. (2013). Hypoxia induced impairment of NK cell cytotoxicity against multiple myeloma can be overcome by IL-2 activation of the NK cells. *PLoS ONE* *8*, e64835.
- Sarkar, S., van Gelder, M., Noort, W., Xu, Y., Rouschop, K.M.A., Groen, R., Schouten, H.C., Tilanus, M.G.J., Germeraad, W.T.V., Martens, A.C.M., et al. (2015). Optimal selection of natural killer cells to kill myeloma: the role of HLA-E and NKG2A. *Cancer Immunol. Immunother.* *64*, 951–963.
- 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.

- Savinko, T., Matikainen, S., Saarialho-Kere, U., Lehto, M., Wang, G., Lehtimäki, S., Karisola, P., Reunala, T., Wolff, H., Lauerma, A., et al. (2012). IL-33 and ST2 in atopic dermatitis: expression profiles and modulation by triggering factors. *J. Invest. Dermatol.* *132*, 1392–1400.
- Schantz, S.P., and Ordonez, N.G. (1991). Quantitation of natural killer cell function and risk of metastatic poorly differentiated head and neck cancer. *Nat. Immun. Cell Growth Regul.* *10*, 278–288.
- Schiering, C., Krausgruber, T., Chomka, A., Fröhlich, A., Adelmann, K., Wohlfert, E.A., Pott, J., Griseri, T., Bollrath, J., Hegazy, A.N., et al. (2014). The alarmin IL-33 promotes regulatory T-cell function in the intestine. *Nature* *513*, 564–568.
- Schlecker, E., Fiegler, N., Arnold, A., Altevogt, P., Rose-John, S., Moldenhauer, G., Sucker, A., Paschen, A., von Strandmann, E.P., Textor, S., et al. (2014). Metalloprotease-mediated tumor cell shedding of B7-H6, the ligand of the natural killer cell-activating receptor NKp30. *Cancer Res.* *74*, 3429–3440.
- Schleypen, J.S., Von Geldern, M., Weiss, E.H., Kotzias, N., Rohrmann, K., Schendel, D.J., Falk, C.S., and Pohla, H. (2003). Renal cell carcinoma-infiltrating natural killer cells express differential repertoires of activating and inhibitory receptors and are inhibited by specific HLA class I allotypes. *Int. J. Cancer* *106*, 905–912.
- Schleypen, J.S., Baur, N., Kammerer, R., Nelson, P.J., Rohrmann, K., Gröne, E.F., Hohenfellner, M., Haferkamp, A., Pohla, H., Schendel, D.J., et al. (2006). Cytotoxic Markers and Frequency Predict Functional Capacity of Natural Killer Cells Infiltrating Renal Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res* *12*, 718–725.
- 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. (2015a). Cytomegalovirus Infection Drives Adaptive Epigenetic Diversification of NK Cells with Altered Signaling and Effector Function. *Immunity* *42*, 443–456.
- 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. (2015b). Cytomegalovirus infection drives adaptive epigenetic diversification of NK cells with altered signaling and effector function. *Immunity* *42*, 443–456.
- Schmitz, J., Owyang, A., Oldham, E., Song, Y., Murphy, E., McClanahan, T.K., Zurawski, G., Moshrefi, M., Qin, J., Li, X., et al. (2005). IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity* *23*, 479–490.
- Schmudde, M., Braun, A., Pende, D., Sonnemann, J., Klier, U., Beck, J.F., Moretta, L., and Bröker, B.M. (2008). Histone deacetylase inhibitors sensitize tumour cells for cytotoxic effects of natural killer cells. *Cancer Lett.* *272*, 110–121.
- Schönberg, K., Sribar, M., Enczmann, J., Fischer, J.C., and Uhrberg, M. (2011). Analyses of HLA-C-specific KIR repertoires in donors with group A and B haplotypes suggest a ligand-instructed model of NK cell receptor acquisition. *Blood* *117*, 98–107.
- Schönfeld, K., Sahn, C., Zhang, C., Naundorf, S., Brendel, C., Odendahl, M., Nowakowska, P., Bönig, H., Köhl, U., Kloess, S., et al. (2015). Selective inhibition of tumor growth by clonal NK cells expressing an ErbB2/HER2-specific chimeric antigen receptor. *Mol. Ther.* *23*, 330–338.
- Schoop, R.A.L., Noteborn, M.H.M., and Baatenburg de Jong, R.J. (2009). A mouse model for oral squamous cell carcinoma. *J Mol Histol* *40*, 177–181.
- Schulze, J., Bickert, T., Beil, F.T., Zaiss, M.M., Albers, J., Wintges, K., Streichert, T., Klaetschke, K., Keller, J., Hissnauer, T.-N., et al. (2011). Interleukin-33 is expressed in differentiated osteoblasts and blocks osteoclast formation from bone marrow precursor cells. *J. Bone Miner. Res.* *26*, 704–717.
- Schuster, I.S., Wikstrom, M.E., Brizard, G., Coudert, J.D., Estcourt, M.J., Manzur, M., O'Reilly, L.A., Smyth, M.J., Trapani, J.A., Hill, G.R., et al. (2014). TRAIL+ NK cells control CD4+ T cell responses during chronic viral infection to limit autoimmunity. *Immunity* *41*, 646–656.
- Sciumè, G., De Angelis, G., Benigni, G., Ponzetta, A., Morrone, S., Santoni, A., and Bernardini, G. (2011). CX3CR1 expression defines 2 KLRG1+ mouse NK-cell subsets with distinct functional properties and positioning in the bone marrow. *Blood* *117*, 4467–4475.
- Scott, I.C., Majithiya, J.B., Sanden, C., Thornton, P., Sanders, P.N., Moore, T., Guscott, M., Corkill, D.J., Erjefält, J.S., and Cohen, E.S. (2018). Interleukin-33 is activated by allergen- and necrosis-associated proteolytic activities to regulate its alarmin activity during epithelial damage. *Scientific Reports* *8*, 1–18.
- 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.* *167*, 2068–2073.
- 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*.
- Semeraro, M., Rusakiewicz, S., Minard-Colin, V., Delahaye, N.F., Enot, D., Vély, F., Marabelle, A., Papoulet, B., Piperoglou, C., Ponzoni, M., et al. (2015). Clinical impact of the NKp30/B7-H6 axis in high-risk neuroblastoma patients. *Sci Transl Med* *7*, 283ra55.

- 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. (2017). IL-21-mediated reversal of NK cell exhaustion facilitates anti-tumour immunity in MHC class I-deficient tumours. *Nat Commun* **8**.
- Serrels, B., McGivern, N., Canel, M., Byron, A., Johnson, S.C., McSorley, H.J., Quinn, N., Taggart, D., Von Kreigsheim, A., Anderton, S.M., et al. (2017). IL-33 and ST2 mediate FAK-dependent antitumor immune evasion through transcriptional networks. *Sci Signal* **10**.
- Shah, U.A., and Mailankody, S. (2020). CAR T and CAR NK cells in multiple myeloma: Expanding the targets. *Best Pract Res Clin Haematol* **33**, 101141.
- Shah, N., Martin-Antonio, B., Yang, H., Ku, S., Lee, D.A., Cooper, L.J.N., Decker, W.K., Li, S., Robinson, S.N., Sekine, T., et al. (2013). Antigen presenting cell-mediated expansion of human umbilical cord blood yields log-scale expansion of natural killer cells with anti-myeloma activity. *PLoS ONE* **8**, e76781.
- Shakoory, B., Fitzgerald, S.M., Lee, S.A., Chi, D.S., and Krishnaswamy, G. (2004). The role of human mast cell-derived cytokines in eosinophil biology. *J. Interferon Cytokine Res.* **24**, 271–281.
- Shao, D., Perros, F., Caramori, G., Meng, C., Dormuller, P., Chou, P.-C., Church, C., Papi, A., Casolari, P., Welsh, D., et al. (2014). Nuclear IL-33 regulates soluble ST2 receptor and IL-6 expression in primary human arterial endothelial cells and is decreased in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **451**, 8–14.
- Sheng, S., Zhang, J., Ai, J., Hao, X., and Luan, R. (2018). Aberrant expression of IL-23/IL-23R in patients with breast cancer and its clinical significance. *Molecular Medicine Reports* **17**, 4639–4644.
- Shi, F.-D., Ljunggren, H.-G., La Cava, A., and Van Kaer, L. (2011). Organ-specific features of natural killer cells. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 658–671.
- 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.
- Shih, H.-Y., Sciumè, G., Poholek, A.C., Vahedi, G., Hirahara, K., Villarino, A.V., Bonelli, M., Bosselut, R., Kanno, Y., Muljo, S.A., et al. (2014). Transcriptional and epigenetic networks of helper T and innate lymphoid cells. *Immunol. Rev.* **261**, 23–49.
- Shimizu, M., Matsuda, A., Yanagisawa, K., Hirota, T., Akahoshi, M., Inomata, N., Ebe, K., Tanaka, K., Sugiura, H., Nakashima, K., et al. (2005). Functional SNPs in the distal promoter of the ST2 gene are associated with atopic dermatitis. *Hum. Mol. Genet.* **14**, 2919–2927.
- Shin, H., Blackburn, S.D., Intlekofer, A.M., Kao, C., Angelosanto, J.M., Reiner, S.L., and Wherry, E.J. (2009). A role for the transcriptional repressor Blimp-1 in CD8(+) T cell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity* **31**, 309–320.
- Shlomovitz, I., Erlich, Z., Speir, M., Zargarian, S., Baram, N., Engler, M., Edry-Botzer, L., Munitz, A., Croker, B.A., and Gerlic, M. (2019). Necroptosis directly induces the release of full-length biologically active IL-33 in vitro and in an inflammatory disease model. *The FEBS Journal* **286**, 507–522.
- Siede, J., Fröhlich, A., Datsi, A., Hegazy, A.N., Varga, D.V., Holeccka, V., Saito, H., Nakae, S., and Löhning, M. (2016). IL-33 Receptor-Expressing Regulatory T Cells Are Highly Activated, Th2 Biased and Suppress CD4 T Cell Proliferation through IL-10 and TGFβ Release. *PLoS ONE* **11**, e0161507.
- 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.
- Silver, M.R., Margulis, A., Wood, N., Goldman, S.J., Kasaian, M., and Chaudhary, D. (2010). IL-33 synergizes with IgE-dependent and IgE-independent agents to promote mast cell and basophil activation. *Inflamm. Res.* **59**, 207–218.
- Single, R.M., Martin, M.P., Gao, X., Meyer, D., Yeager, M., Kidd, J.R., Kidd, K.K., and Carrington, M. (2007). Global diversity and evidence for coevolution of KIR and HLA. *Nat. Genet.* **39**, 1114–1119.
- 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.
- Skak, K., Frederiksen, K.S., and Lundsgaard, D. (2008). Interleukin-21 activates human natural killer cells and modulates their surface receptor expression. *Immunology* **123**, 575–583.
- Skeate, R., Singh, C., Cooley, S., Geller, M., Northouse, J., Welbig, J., Slungaard, A., Miller, J., and McKenna, D. (2013). Hemolytic anemia due to passenger lymphocyte syndrome in solid malignancy patients treated with allogeneic natural killer cell products. *Transfusion* **53**, 419–423.
- 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). TGFβ drives mitochondrial dysfunction in peripheral blood NK cells during metastatic breast cancer. *BioRxiv* 648501.

- Smigiel, K.S., Richards, E., Srivastava, S., Thomas, K.R., Dudda, J.C., Klonowski, K.D., and Campbell, D.J. (2014). CCR7 provides localized access to IL-2 and defines homeostatically distinct regulatory T cell subsets. *J. Exp. Med.* *211*, 121–136.
- Smith, D.E. (2010). IL-33: a tissue derived cytokine pathway involved in allergic inflammation and asthma. *Clin. Exp. Allergy* *40*, 200–208.
- Smithgall, M.D., Comeau, M.R., Park Yoon, B.-R., Kaufman, D., Armitage, R., and Smith, D.E. (2008). IL-33 amplifies both Th1- and Th2-type responses through its activity on human basophils, allergen-reactive Th2 cells, iNKT and NK Cells. *Int Immunol* *20*, 1019–1030.
- Smyth, M.J., Thia, K.Y., Cretney, E., Kelly, J.M., Snook, M.B., Forbes, C.A., and Scalzo, A.A. (1999). Perforin is a major contributor to NK cell control of tumor metastasis. *J. Immunol.* *162*, 6658–6662.
- Smyth, M.J., Crowe, N.Y., and Godfrey, D.I. (2001). NK cells and NKT cells collaborate in host protection from methylcholanthrene-induced fibrosarcoma. *Int. Immunol.* *13*, 459–463.
- Smyth, M.J., 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.
- Smyth, M.J., Teng, M.W.L., Swann, J., Kyparissoudis, K., Godfrey, D.I., and Hayakawa, Y. (2006). CD4+CD25+ T regulatory cells suppress NK cell-mediated immunotherapy of cancer. *J. Immunol.* *176*, 1582–1587.
- Snelgrove, R.J., Gregory, L.G., Peiró, T., Akthar, S., Campbell, G.A., Walker, S.A., and Lloyd, C.M. (2014). *Alternaria*-derived serine protease activity drives IL-33-mediated asthma exacerbations. *J. Allergy Clin. Immunol.* *134*, 583-592.e6.
- Sokolosky, J.T., Trotta, E., Parisi, G., Picton, L., Su, L.L., Le, A.C., Chhabra, A., Silveria, S.L., George, B.M., King, I.C., et al. (2018). Selective targeting of engineered T cells using orthogonal IL-2 cytokine-receptor complexes. *Science* *359*, 1037–1042.
- Söderström, K., Stein, E., Colmenero, P., Purath, U., Müller-Ladner, U., de Matos, C.T., Tarner, I.H., Robinson, W.H., and Engleman, E.G. (2010). Natural killer cells trigger osteoclastogenesis and bone destruction in arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *107*, 13028–13033.
- Souza-Fonseca-Guimaraes, F., Young, A., Mittal, D., Martinet, L., Bruedigam, C., Takeda, K., Andoniou, C.E., Degli-Esposti, M.A., Hill, G.R., and Smyth, M.J. (2015). NK cells require IL-28R for optimal in vivo activity. *PNAS* *112*, E2376–E2384.
- Spanholtz, J., Tordoir, M., Eissens, D., Preijers, F., van der Meer, A., Joosten, I., Schaap, N., de Witte, T.M., and Dolstra, H. (2010). High log-scale expansion of functional human natural killer cells from umbilical cord blood CD34-positive cells for adoptive cancer immunotherapy. *PLoS ONE* *5*, e9221.
- Spits, H., and Cupedo, T. (2012). Innate lymphoid cells: emerging insights in development, lineage relationships, and function. *Annu. Rev. Immunol.* *30*, 647–675.
- Spits, H., Artis, D., Colonna, M., Dieffenbach, 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.
- Sponheim, J., Pollheimer, J., Olsen, T., Balogh, J., Hammarström, C., Loos, T., Kasprzycka, M., Sørensen, D.R., Nilsen, H.R., Küchler, A.M., et al. (2010). Inflammatory bowel disease-associated interleukin-33 is preferentially expressed in ulceration-associated myofibroblasts. *Am. J. Pathol.* *177*, 2804–2815.
- Spreu, J., Kuttruff, S., Stejfova, V., Dennehy, K.M., Schitteck, B., and Steinle, A. (2010). Interaction of C-type lectin-like receptors Nkp65 and KACL facilitates dedicated immune recognition of human keratinocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *107*, 5100–5105.
- Stanietsky, N., Simic, H., Arapovic, J., Toporik, A., Levy, O., Novik, A., Levine, Z., Beiman, M., Dassa, L., Achdout, H., et al. (2009). The interaction of TIGIT with PVRL2 inhibits human NK cell cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 17858–17863.
- 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.
- Stegmann, K.A., Björkström, N.K., Veber, H., Ciesek, S., Riese, P., Wiegand, J., Hadem, J., Suneetha, P.V., Jaroszewicz, J., Wang, C., et al. (2010). Interferon-alpha-induced TRAIL on natural killer cells is associated with control of hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* *138*, 1885–1897.
- Stetson, D.B., Mohrs, M., Reinhardt, R.L., Baron, J.L., Wang, Z.-E., Gapin, L., Kronenberg, M., and Locksley, R.M. (2003). Constitutive cytokine mRNAs mark natural killer (NK) and NK T cells poised for rapid effector function. *J. Exp. Med.* *198*, 1069–1076.
- Stewart, C.A., Laugier-Anfossi, F., Vély, F., Saulquin, X., Riedmuller, J., Tisserant, A., Gauthier, L., Romagné, F., Ferracci, G., Arosa, F.A., et al. (2005). Recognition of peptide–MHC class I complexes by activating killer immunoglobulin-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 13224–13229.
- Stolarski, B., Kurowska-Stolarska, M., Kewin, P., Xu, D., and Liew, F.Y. (2010). IL-33 exacerbates eosinophil-mediated airway inflammation. *J. Immunol.* *185*, 3472–3480.

- Strayer, D.R., Carter, W.A., Mayberry, S.D., Pequignot, E., and Brodsky, I. (1984). Low Natural Cytotoxicity of Peripheral Blood Mononuclear Cells in Individuals with High Familial Incidences of Cancer. *Cancer Res* *44*, 370–374.
- Street, S.E.A., Cretney, E., and Smyth, M.J. (2001). Perforin and interferon- γ activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. *Blood* *97*, 192–197.
- Strengell, M., Matikainen, S., Sirén, J., Lehtonen, A., Foster, D., Julkunen, I., and Sareneva, T. (2003). IL-21 in synergy with IL-15 or IL-18 enhances IFN- γ production in human NK and T cells. *J. Immunol.* *170*, 5464–5469.
- 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.
- Su, L., Zhou, Q., Wang, C., Wu, X., Wang, X., Li, J., Zhu, Z., and Liu, B. (2015). Abstract 5069: IL-33 secreted by cancer-associated fibroblasts mediates epithelial-stromal interactions and promotes gastric cancer invasion via ERK signaling pathway. *Cancer Res* *75*, 5069–5069.
- Su, Z., Lin, J., Lu, F., Zhang, X., Zhang, L., Gandhi, N.B., de Paiva, C.S., Pflugfelder, S.C., and Li, D.-Q. (2013). Potential autocrine regulation of interleukin-33/ST2 signaling of dendritic cells in allergic inflammation. *Mucosal Immunol* *6*, 921–930.
- Sun, C., Fu, B., Gao, Y., Liao, X., Sun, R., Tian, Z., and Wei, H. (2012). TGF- β 1 Down-Regulation of NKG2D/DAP10 and 2B4/SAP Expression on Human NK Cells Contributes to HBV Persistence. *PLOS Pathogens* *8*, e1002594.
- 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.
- Sun, H., Huang, Q., Huang, M., Wen, H., Lin, R., Zheng, M., Qu, K., Li, K., Wei, H., Xiao, W., et al. (2019). Human CD96 Correlates to Natural Killer Cell Exhaustion and Predicts the Prognosis of Human Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology* *70*, 168–183.
- Sun, J., Bird, C.H., Sutton, V., McDonald, L., Coughlin, P.B., De Jong, T.A., Trapani, J.A., and Bird, P.I. (1996). A cytosolic granzyme B inhibitor related to the viral apoptotic regulator cytokine response modifier A is present in cytotoxic lymphocytes. *J. Biol. Chem.* *271*, 27802–27809.
- Sun, J.C., Beilke, J.N., and Lanier, L.L. (2009). Adaptive Immune Features of Natural Killer Cells. *Nature* *457*, 557–561.
- Sun, M., Bai, Y., Zhao, S., Liu, X., Gao, Y., Wang, L., Liu, B., Ma, D., and Ma, C. (2018). Gram-negative bacteria facilitate tumor progression through TLR4/IL-33 pathway in patients with non-small-cell lung cancer. *Oncotarget* *9*, 13462–13473.
- Sun, P., Ben, Q., Tu, S., Dong, W., Qi, X., and Wu, Y. (2011). Serum interleukin-33 levels in patients with gastric cancer. *Dig. Dis. Sci.* *56*, 3596–3601.
- Suzukawa, M., Iikura, M., Koketsu, R., Nagase, H., Tamura, C., Komiya, A., Nakae, S., Matsushima, K., Ohta, K., Yamamoto, K., et al. (2008a). An IL-1 cytokine member, IL-33, induces human basophil activation via its ST2 receptor. *J. Immunol.* *181*, 5981–5989.
- Suzukawa, M., Koketsu, R., Iikura, M., Nakae, S., Matsumoto, K., Nagase, H., Saito, H., Matsushima, K., Ohta, K., Yamamoto, K., et al. (2008b). Interleukin-33 enhances adhesion, CD11b expression and survival in human eosinophils. *Lab. Invest.* *88*, 1245–1253.
- Szczepanski, M.J., Szajnik, M., Welsh, A., Whiteside, T.L., and Boyiadzis, M. (2011). Blast-derived microvesicles in sera from patients with acute myeloid leukemia suppress natural killer cell function via membrane-associated transforming growth factor- β 1. *Haematologica* *96*, 1302–1309.
- Tago, K., Noda, T., Hayakawa, M., Iwahana, H., Yanagisawa, K., Yashiro, T., and Tominaga, S. (2001). Tissue distribution and subcellular localization of a variant form of the human ST2 gene product, ST2V. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *285*, 1377–1383.
- Tak, P.P., Kummer, J.A., Hack, C.E., Daha, M.R., Smeets, T.J., Erkelens, G.W., Meinders, A.E., Kluin, P.M., and Breedveld, F.C. (1994). Granzyme-positive cytotoxic cells are specifically increased in early rheumatoid synovial tissue. *Arthritis Rheum.* *37*, 1735–1743.
- Takanami, I., Takeuchi, K., and Giga, M. (2001). The prognostic value of natural killer cell infiltration in resected pulmonary adenocarcinoma. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* *121*, 1058–1063.
- Takeda, K., and Dennert, G. (1993). The development of autoimmunity in C57BL/6 lpr mice correlates with the disappearance of natural killer type 1-positive cells: evidence for their suppressive action on bone marrow stem cell proliferation, B cell immunoglobulin secretion, and autoimmune symptoms. *J. Exp. Med.* *177*, 155–164.
- Takeda, K., Oshima, H., Hayakawa, Y., Akiba, H., Atsuta, M., Kobata, T., Kobayashi, K., Ito, M., Yagita, H., and Okumura, K. (2000a). CD27-Mediated Activation of Murine NK Cells. *The Journal of Immunology* *164*, 1741–1745.
- Takeda, K., Hayakawa, Y., Atsuta, M., Hong, S., Van Kaer, L., Kobayashi, K., Ito, M., Yagita, H., and Okumura, K. (2000b). Relative contribution of NK and NKT cells to the anti-metastatic activities of IL-12. *Int. Immunol.* *12*, 909–914.

- Takeda, K., Hayakawa, Y., Smyth, M.J., Kayagaki, N., Yamaguchi, N., Kakuta, S., Iwakura, Y., Yagita, H., and Okumura, K. (2001). Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells. *Nat. Med.* *7*, 94–100.
- Takeichi, M. (1993). Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. *Curr. Opin. Cell Biol.* *5*, 806–811.
- Talabot-Ayer, D., Lamacchia, C., Gabay, C., and Palmer, G. (2009). Interleukin-33 is biologically active independently of caspase-1 cleavage. *J. Biol. Chem.* *284*, 19420–19426.
- Tamagawa-Mineoka, R., Okuzawa, Y., Masuda, K., and Katoh, N. (2014). Increased serum levels of interleukin 33 in patients with atopic dermatitis. *J. Am. Acad. Dermatol.* *70*, 882–888.
- Tang, X., Yang, L., Li, Z., Nalin, A.P., Dai, H., Xu, T., Yin, J., You, F., Zhu, M., Shen, W., et al. (2018). First-in-man clinical trial of CAR NK-92 cells: safety test of CD33-CAR NK-92 cells in patients with relapsed and refractory acute myeloid leukemia. *Am J Cancer Res* *8*, 1083–1089.
- Tarek, N., Ludeuc, J.-B.L., Gallagher, M.M., Zheng, J., Venstrom, J.M., Chamberlain, E., Modak, S., Heller, G., Dupont, B., Cheung, N.-K.V., et al. (2012). Unlicensed NK cells target neuroblastoma following anti-GD2 antibody treatment. *J Clin Invest* *122*, 3260–3270.
- Tata, A., and Brossay, L. (2018). Role of the KLRG1 pathway in the immune response. *The Journal of Immunology* *200*, 49.9-49.9.
- Tesi, B., Schlums, H., Cichocki, F., and Bryceson, Y.T. (2016). Epigenetic Regulation of Adaptive NK Cell Diversification. *Trends in Immunology* *37*, 451–461.
- Tieng, V., Le Bouguéneq, C., du Merle, L., Bertheau, P., Desreumaux, P., Janin, A., Charron, D., and Toubert, A. (2002). Binding of *Escherichia coli* adhesin AfaE to CD55 triggers cell-surface expression of the MHC class I-related molecule MICA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *99*, 2977–2982.
- Tominaga, S. (1989). A putative protein of a growth specific cDNA from BALB/c-3T3 cells is highly similar to the extracellular portion of mouse interleukin 1 receptor. *FEBS Lett.* *258*, 301–304.
- Tominaga, S., Hayakawa, M., Tsuda, H., Ohta, S., and Yanagisawa, K. (2013). Presence of a novel exon 2E encoding a putative transmembrane protein in human IL-33 gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *430*, 969–974.
- Tong, X., Barbour, M., Hou, K., Gao, C., Cao, S., Zheng, J., Zhao, Y., Mu, R., and Jiang, H.-R. (2016). Interleukin-33 predicts poor prognosis and promotes ovarian cancer cell growth and metastasis through regulating ERK and JNK signaling pathways. *Mol Oncol* *10*, 113–125.
- Topham, N.J., and Hewitt, E.W. (2009). Natural killer cell cytotoxicity: how do they pull the trigger? *Immunology* *128*, 7–15.
- Torelli, G.F., Rozera, C., Santodonato, L., Peragine, N., D’agostino, G., Montefiore, E., Napolitano, M.R., Monque, D.M., Carlei, D., Mariglia, P., et al. (2015). A good manufacturing practice method to ex vivo expand natural killer cells for clinical use. *Blood Transfus* *13*, 464–471.
- Torres, D., Köhler, A., Delbaube, S., Caminschi, I., Lahoud, M.H., Shortman, K., and Flamand, V. (2016). IL-12p40/IL-10 Producing preCD8 α /Clec9A+ Dendritic Cells Are Induced in Neonates upon *Listeria monocytogenes* Infection. *PLOS Pathogens* *12*, e1005561.
- Townsend, M.J., Weinmann, A.S., Matsuda, J.L., Salomon, R., Farnham, P.J., Biron, C.A., Gapin, L., and Glimcher, L.H. (2004). T-bet regulates the terminal maturation and homeostasis of NK and Valpha14i NKT cells. *Immunity* *20*, 477–494.
- Trapani, J.A. (2001). Granzymes: a family of lymphocyte granule serine proteases. *Genome Biol* *2*, reviews3014.1-reviews3014.7.
- Trapnell, C., Cacchiarelli, D., Grimsby, J., Pokharel, P., Li, S., Morse, M., Lennon, N.J., Livak, K.J., Mikkelsen, T.S., and Rinn, J.L. (2014). The dynamics and regulators of cell fate decisions are revealed by pseudotemporal ordering of single cells. *Nature Biotechnology* *32*, 381–386.
- Travers, J., Rochman, M., Miracle, C.E., Habel, J.E., Brusilovsky, M., Caldwell, J.M., Rymer, J.K., and Rothenberg, M.E. (2018). Chromatin regulates IL-33 release and extracellular cytokine activity. *Nat Commun* *9*, 3244.
- Trifilo, M.J., Montalto-Morrison, C., Stiles, L.N., Hurst, K.R., Hardison, J.L., Manning, J.E., Masters, P.S., and Lane, T.E. (2004). CXC chemokine ligand 10 controls viral infection in the central nervous system: evidence for a role in innate immune response through recruitment and activation of natural killer cells. *J. Virol.* *78*, 585–594.
- Trinchieri, G., Matsumoto-Kobayashi, M., Clark, S.C., Sehra, J., London, L., and Perussia, B. (1984). Response of resting human peripheral blood natural killer cells to interleukin 2. *J. Exp. Med.* *160*, 1147–1169.
- Trněný, M., Lamy, T., Walewski, J., Belada, D., Mayer, J., Radford, J., Jurczak, W., Morschhauser, F., Alexeeva, J., Rule, S., et al. (2016). Lenalidomide versus investigator’s choice in relapsed or refractory mantle cell lymphoma (MCL-002; SPRINT): a phase 2, randomised, multicentre trial. *Lancet Oncol.* *17*, 319–331.
- Trotta, R., Dal Col, J., Yu, J., Ciarlariello, D., Thomas, B., Zhang, X., Allard, J., Wei, M., Mao, H., Byrd, J.C., et al. (2008). TGF-beta utilizes SMAD3 to inhibit CD16-mediated IFN-gamma production and antibody-dependent cellular cytotoxicity in human NK cells. *J. Immunol.* *181*, 3784–3792.

- Tsuda, H., Komine, M., Karakawa, M., Etoh, T., Tominaga, S.-I., and Ohtsuki, M. (2012). Novel splice variants of IL-33: differential expression in normal and transformed cells. *J. Invest. Dermatol.* *132*, 2661–2664.
- Tu, M.M., Rahim, M.M.A., Sayed, C., Mahmoud, A.B., and Makrigrannis, A.P. (2017). Immunosurveillance and Immunoediting of Breast Cancer via Class I MHC Receptors. *Cancer Immunol Res* *5*, 1016–1028.
- Turnquist, H.R., Sumpster, T.L., Tsung, A., Zahorchak, A.F., Nakao, A., Nau, G.J., Liew, F.Y., Geller, D.A., and Thomson, A.W. (2008). IL-1 β -Driven ST2L Expression Promotes Maturation Resistance in Rapamycin-Conditioned Dendritic Cells. *The Journal of Immunology* *181*, 62–72.
- Turnquist, H.R., Cardinal, J., Macedo, C., Rosborough, B.R., Sumpster, T.L., Geller, D.A., Metes, D., and Thomson, A.W. (2010). mTOR and GSK-3 shape the CD4+ T-cell stimulatory and differentiation capacity of myeloid DCs after exposure to LPS. *Blood* *115*, 4758–4769.
- Turnquist, H.R., Zhao, Z., Rosborough, B.R., Liu, Q., Castellaneta, A., Isse, K., Wang, Z., Lang, M., Stolz, D.B., Zheng, X.X., et al. (2011). IL-33 expands suppressive CD11b+ Gr-1(int) and regulatory T cells, including ST2L+ Foxp3+ cells, and mediates regulatory T cell-dependent promotion of cardiac allograft survival. *J. Immunol.* *187*, 4598–4610.
- Ugucconi, M., Mackay, C.R., Ochensberger, B., Loetscher, P., Rhis, S., LaRosa, G.J., Rao, P., Ponath, P.D., Baggiolini, M., and Dahinden, C.A. (1997). High expression of the chemokine receptor CCR3 in human blood basophils. Role in activation by eotaxin, MCP-4, and other chemokines. *J. Clin. Invest.* *100*, 1137–1143.
- Uherek, C., Tonn, T., Uherek, B., Becker, S., Schnierle, B., Klingemann, H.-G., and Wels, W. (2002). Retargeting of natural killer-cell cytolytic activity to ErbB2-expressing cancer cells results in efficient and selective tumor cell destruction. *Blood* *100*, 1265–1273.
- Untersmayr, E., Bakos, N., Schöll, I., Kundi, M., Roth-Walter, F., Szalai, K., Riemer, A.B., Ankersmit, H.J., Scheiner, O., Boltz-Nitulescu, G., et al. (2005). Anti-ulcer drugs promote IgE formation toward dietary antigens in adult patients. *FASEB J.* *19*, 656–658.
- Urlaub, D., Höfer, K., Müller, M.-L., and Watzl, C. (2017). LFA-1 Activation in NK Cells and Their Subsets: Influence of Receptors, Maturation, and Cytokine Stimulation. *J. Immunol.* *198*, 1944–1951.
- Ushach, I., and Zlotnik, A. (2016). Biological role of granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) on cells of the myeloid lineage. *J. Leukoc Biol* *100*, 481–489.
- Väisänen, T., Väisänen, M.-R., Autio-Harmainen, H., and Pihlajaniemi, T. (2005). Type XIII collagen expression is induced during malignant transformation in various epithelial and mesenchymal tumours. *J. Pathol.* *207*, 324–335.
- Vallera, D.A., Felices, M., McElmurry, R., McCullar, V., Zhou, X., Schmohl, J.U., Zhang, B., Lenvik, A.J., Panoskaltis-Mortari, A., Verneris, M.R., et al. (2016). IL15 Trispecific Killer Engagers (TriKE) Make Natural Killer Cells Specific to CD33+ Targets While Also Inducing Persistence, In Vivo Expansion, and Enhanced Function. *Clin. Cancer Res.* *22*, 3440–3450.
- Van Der Weyden, C., Bagot, M., Neeson, P., Darcy, P.K., and Prince, H.M. (2018). IPH4102, a monoclonal antibody directed against the immune receptor molecule KIR3DL2, for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma. *Expert Opin Investig Drugs* *27*, 691–697.
- Vance, R.E., Kraft, J.R., Altman, J.D., Jensen, P.E., and Raulet, D.H. (1998). Mouse CD94/NKG2A is a natural killer cell receptor for the nonclassical major histocompatibility complex (MHC) class I molecule Qa-1(b). *J. Exp. Med.* *188*, 1841–1848.
- 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.
- 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.
- Vasanthakumar, A., and Kallies, A. (2015). The Regulatory T Cell: Jack-Of-All-Trades. *Trends in Immunology* *36*, 756–758.
- Vasanthakumar, A., Moro, K., Xin, A., Liao, Y., Gloury, R., Kawamoto, S., Fagarasan, S., Mielke, L.A., Afshar-Sterle, S., Masters, S.L., et al. (2015). The transcriptional regulators IRF4, BATF and IL-33 orchestrate development and maintenance of adipose tissue-resident regulatory T cells. *Nat. Immunol.* *16*, 276–285.
- Vasu, S., Berg, M., Davidson-Moncada, J., Tian, X., Cullis, H., and Childs, R.W. (2015). A novel method to expand large numbers of CD56(+) natural killer cells from a minute fraction of selectively accessed cryopreserved cord blood for immunotherapy after transplantation. *Cytotherapy* *17*, 1582–1593.
- Venkatasubramanian, S., Cheekatla, S., Paidipally, P., Tripathi, D., Welch, E., Tvinnereim, A.R., Nurieva, R., and Vankayalapati, R. (2017). IL-21-dependent expansion of memory-like NK cells enhances protective immune responses against *Mycobacterium tuberculosis*. *Mucosal Immunol* *10*, 1031–1042.
- Verri, W.A., Guerrero, A.T.G., Fukada, S.Y., Valerio, D.A., Cunha, T.M., Xu, D., Ferreira, S.H., Liew, F.Y., and Cunha, F.Q. (2008). IL-33 mediates antigen-induced cutaneous and articular hypernociception in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *105*, 2723–2728.

- Verronèse, E., Delgado, A., Valladeau-Guilemond, J., Garin, G., Guillemaut, S., Tredan, O., Ray-Coquard, I., Bachelot, T., N'Kodia, A., Bardin-Dit-Courageot, C., et al. (2016). Immune cell dysfunctions in breast cancer patients detected through whole blood multi-parametric flow cytometry assay. *Oncolimmunology* 5, e1100791.
- Vieillard, V., Strominger, J.L., and Debré, P. (2005). NK cytotoxicity against CD4+ T cells during HIV-1 infection: A gp41 peptide induces the expression of an NKp44 ligand. *PNAS* 102, 10981–10986.
- Viel, S., Marçais, A., Guimaraes, F.S.-F., Loftus, R., Rabilloud, J., Grau, M., Degouve, S., Djebali, S., Sanlaville, A., Charrier, E., et al. TGF- β inhibits the activation and functions of NK cells by repressing the mTOR pathway. 15.
- Villarreal, D.O., Wise, M.C., Walters, J.N., Reuschel, E.L., Choi, M.J., Obeng-Adjei, N., Yan, J., Morrow, M.P., and Weiner, D.B. (2014). Alarmin IL-33 acts as an immunoadjuvant to enhance antigen-specific tumor immunity. *Cancer Res.* 74, 1789–1800.
- 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.
- Vincent, M., Teppaz, G., Lajoie, L., Solé, V., Bessard, A., Maillason, M., Loisel, S., Béchar, D., Clémenceau, B., Thibault, G., et al. (2014). Highly potent anti-CD20-RL1 immunocytokine targeting established human B lymphoma in SCID mouse. *MAbs* 6, 1026–1037.
- Vitale, M., Bottino, C., Sivori, S., Sanseverino, L., Castriconi, R., Marcenaro, E., Augugliaro, R., Moretta, L., and Moretta, A. (1998). NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis. *J. Exp. Med.* 187, 2065–2072.
- Vitale, M., Falco, M., Castriconi, R., Parolini, S., Zambello, R., Semenzato, G., Biassoni, R., Bottino, C., Moretta, L., and Moretta, A. (2001). Identification of NKp80, a novel triggering molecule expressed by human NK cells. *Eur. J. Immunol.* 31, 233–242.
- Vitale, M., Della Chiesa, M., Carlomagno, S., Romagnani, C., Thiel, A., Moretta, L., and Moretta, A. (2004). The small subset of CD56^{bright}CD16⁺ natural killer cells is selectively responsible for both cell proliferation and interferon- γ production upon interaction with dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 34, 1715–1722.
- Vitale, M., Della Chiesa, M., Carlomagno, S., Pende, D., Aricò, M., Moretta, L., and Moretta, A. (2005). NK-dependent DC maturation is mediated by TNF α and IFN γ released upon engagement of the NKp30 triggering receptor. *Blood* 106, 566–571.
- Vitenshtein, A., Charpak-Amikam, Y., Yamin, R., Bauman, Y., Isaacson, B., Stein, N., Berhani, O., Dassa, L., Gamliel, M., Gur, C., et al. (2016). NK cell recognition of *Candida glabrata* through binding of NKp46 and NCR1 to fungal ligands Epa1, Epa6, and Epa7. *Cell Host Microbe* 20, 527–534.
- Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., and Ugolini, S. (2008). Functions of natural killer cells. *Nat. Immunol.* 9, 503–510.
- Vocca, L., Di Sano, C., Uasuf, C.G., Sala, A., Riccobono, L., Gangemi, S., Albano, G.D., Bonanno, A., Gagliardo, R., and Profita, M. (2015). IL-33/ST2 axis controls Th2/IL-31 and Th17 immune response in allergic airway diseases. *Immunobiology* 220, 954–963.
- Vosshenrich, C.A.J., Ranson, T., Samson, S.I., Corcuff, E., Colucci, F., Rosmaraki, E.E., and Di Santo, J.P. (2005). Roles for common cytokine receptor gamma-chain-dependent cytokines in the generation, differentiation, and maturation of NK cell precursors and peripheral NK cells in vivo. *J. Immunol.* 174, 1213–1221.
- 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). CD56^{bright} NK cells exhibit potent antitumor responses following IL-15 priming. *J. Clin. Invest.* 127, 4042–4058.
- Wagner, K., Schulz, P., Scholz, A., Wiedenmann, B., and Menrad, A. (2008). The Targeted Immunocytokine L19-IL2 Efficiently Inhibits the Growth of Orthotopic Pancreatic Cancer. *Clin Cancer Res* 14, 4951–4960.
- Walczak, H., Miller, R.E., Ariail, K., Gliniak, B., Griffith, T.S., Kubin, M., Chin, W., Jones, J., Woodward, A., Le, T., et al. (1999). Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat. Med.* 5, 157–163.
- Walzer, T., Chiossone, L., Chaix, J., Calver, A., Carozzo, C., Garrigue-Antar, L., Jacques, Y., Baratin, M., Tomasello, E., and Vivier, E. (2007). Natural killer cell trafficking in vivo requires a dedicated sphingosine 1-phosphate receptor. *Nature Immunology* 8, 1337–1344.
- Wang, C., Chen, Z., Bu, X., Han, Y., Shan, S., Ren, T., and Song, W. (2016a). IL-33 signaling fuels outgrowth and metastasis of human lung cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 479, 461–468.
- Wang, G., Tsoi, M., Spolski, R., Lou, Y., Ozaki, K., Feng, C., Kim, G., Leonard, W.J., and Hwu, P. (2003). In vivo antitumor activity of interleukin 21 mediated by natural killer cells. *Cancer Res.* 63, 9016–9022.
- 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. *Journal of Virology* 87, 11626–11636.

- Wang, J.-X., Kaieda, S., Ameri, S., Fishgal, N., Dwyer, D., Dellinger, A., Kepley, C.L., Gurish, M.F., and Nigrovic, P.A. (2014a). IL-33/ST2 axis promotes mast cell survival via BCLXL. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *111*, 10281–10286.
- Wang, K.S., Frank, D.A., and Ritz, J. (2000). Interleukin-2 enhances the response of natural killer cells to interleukin-12 through up-regulation of the interleukin-12 receptor and STAT4. *Blood* *95*, 3183–3190.
- Wang, L., Li, H., Liang, F., Hong, Y., Jiang, S., and Xiao, L. (2014b). Examining IL-33 expression in the cervix of HPV-infected patients: a preliminary study comparing IL-33 levels in different stages of disease and analyzing its potential association with IFN- γ . *Med. Oncol.* *31*, 143.
- Wang, L., Tang, J., Yang, X., Zanvit, P., Cui, K., Ku, W.L., Jin, W., Zhang, D., Goldberg, N., Cain, A., et al. (2020). TGF- β induces ST2 and programs ILC2 development. *Nat Commun* *11*, 35.
- Wang, R., Jaw, J.J., Stutzman, N.C., Zou, Z., and Sun, P.D. (2012). Natural killer cell-produced IFN- γ and TNF- α induce target cell cytotoxicity through up-regulation of ICAM-1. *Journal of Leukocyte Biology* *91*, 299–309.
- Wang, W., Erbe, A.K., Hank, J.A., Morris, Z.S., and Sondel, P.M. (2015). NK Cell-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity in Cancer Immunotherapy. *Front Immunol* *6*.
- Wang, Y., Chaudhri, G., Jackson, R.J., and Karupiah, G. (2009). IL-12p40 and IL-18 play pivotal roles in orchestrating the cell-mediated immune response to a poxvirus infection. *J. Immunol.* *183*, 3324–3331.
- Wang, Z., Xu, L., Chang, Y., Zhou, L., Fu, H., Zhang, W., Yang, Y., and Xu, J. (2016b). IL-33 is associated with unfavorable postoperative survival of patients with clear-cell renal cell carcinoma. *Tumour Biol.* *37*, 11127–11134.
- 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.* *154*, 5144–5152.
- Watanabe, M., Nakamoto, K., Inui, T., Sada, M., Honda, K., Tamura, M., Ogawa, Y., Yokoyama, T., Saraya, T., Kurai, D., et al. (2018). Serum sST2 levels predict severe exacerbation of asthma. *Respiratory Research* *19*, 169.
- Weber, B.N., Chi, A.W.-S., Chavez, A., Yashiro-Ohtani, Y., Yang, Q., Shestova, O., and Bhandoola, A. (2011). A critical role for TCF-1 in T-lineage specification and differentiation. *Nature* *476*, 63–68.
- Weinberg, E.O., Shimp, M., De Keulenaer, G.W., MacGillivray, C., Tominaga, S., Solomon, S.D., Rouleau, J.-L., and Lee, R.T. (2002). Expression and regulation of ST2, an interleukin-1 receptor family member, in cardiomyocytes and myocardial infarction. *Circulation* *106*, 2961–2966.
- Weinberg, E.O., Ferran, B., Tsukahara, Y., Hatch, M.M.S., Han, J., Murdoch, C.E., and Matsui, R. (2019). IL-33 induction and signaling are controlled by glutaredoxin-1 in mouse macrophages. *PLOS ONE* *14*, e0210827.
- Weiss, G.R., Margolin, K.A., Aronson, F.R., Sznol, M., Atkins, M.B., Dutcher, J.P., Gaynor, E.R., Boldt, D.H., Doroshow, J.H., and Bar, M.H. (1992). A randomized phase II trial of continuous infusion interleukin-2 or bolus injection interleukin-2 plus lymphokine-activated killer cells for advanced renal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.* *10*, 275–281.
- Welte, S., Kuttruff, S., Waldhauer, I., and Steinle, A. (2006). Mutual activation of natural killer cells and monocytes mediated by Nkp80-AICL interaction. *Nat. Immunol.* *7*, 1334–1342.
- Wen, Q., Wu, F., Yang, J., Wu, J., Zhang, X., He, M., Wu, T., and Cheng, L. (2015). A single-nucleotide polymorphism in the interleukin-1 receptor-associated protein gene is associated with impaired glucose regulation and type 2 diabetes in a case-controlled study. *Biomed Rep* *3*, 549–553.
- Wen, T., Besse, J.A., Mingler, M.K., Fulkerson, P.C., and Rothenberg, M.E. (2013). Eosinophil adoptive transfer system to directly evaluate pulmonary eosinophil trafficking in vivo. *PNAS* *110*, 6067–6072.
- Wen, Y.-H., Lin, H.-Q., Li, H., Zhao, Y., Lui, V.W.Y., Chen, L., Wu, X.-M., Sun, W., and Wen, W.-P. (2019). Stromal interleukin-33 promotes regulatory T cell-mediated immunosuppression in head and neck squamous cell carcinoma and correlates with poor prognosis. *Cancer Immunol. Immunother.* *68*, 221–232.
- Wendel, M., Galani, I.E., Suri-Payer, E., and Cerwenka, A. (2008). Natural Killer Cell Accumulation in Tumors Is Dependent on IFN- γ and CXCR3 Ligands. *Cancer Res* *68*, 8437–8445.
- Wendt, K., Wilk, E., Buyny, S., Buer, J., Schmidt, R.E., and Jacobs, R. (2006). Gene and protein characteristics reflect functional diversity of CD56dim and CD56bright NK cells. *J. Leukoc. Biol.* *80*, 1529–1541.
- Wendt, K., Wilk, E., Buyny, S., Schmidt, R.E., and Jacobs, R. (2007). Interleukin-21 differentially affects human natural killer cell subsets. *Immunology* *122*, 486–495.
- Werenskiold, A.K., Hoffmann, S., and Klemenz, R. (1989). Induction of a mitogen-responsive gene after expression of the Ha-ras oncogene in NIH 3T3 fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* *9*, 5207–5214.

- West, W.H., Tauer, K.W., Yannelli, J.R., Marshall, G.D., Orr, D.W., Thurman, G.B., and Oldham, R.K. (1987). Constant-infusion recombinant interleukin-2 in adoptive immunotherapy of advanced cancer. *N. Engl. J. Med.* *316*, 898–905.
- van de Wetering, D., de Paus, R.A., van Dissel, J.T., and van de Vosse, E. (2009). IL-23 modulates CD56+/CD3- NK cell and CD56+/CD3+ NK-like T cell function differentially from IL-12. *Int. Immunol.* *21*, 145–153.
- Wherry, E.J., and Kurachi, M. (2015). Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol* *15*, 486–499.
- Wiesmayr, S., Webber, S.A., Macedo, C., Popescu, I., Smith, L., Luce, J., and Metes, D. (2012). Decreased NKp46 and NKG2D and elevated PD-1 are associated with altered NK-cell function in pediatric transplant patients with PTLN. *Eur. J. Immunol.* *42*, 541–550.
- Willebrand, R., and Voehringer, D. (2016). IL-33-Induced Cytokine Secretion and Survival of Mouse Eosinophils Is Promoted by Autocrine GM-CSF. *PLoS ONE* *11*, e0163751.
- Wilson, E.B., El-Jawhari, J.J., Neilson, A.L., Hall, G.D., Melcher, A.A., Meade, J.L., and Cook, G.P. (2011). Human tumour immune evasion via TGF- β blocks NK cell activation but not survival allowing therapeutic restoration of anti-tumour activity. *PLoS ONE* *6*, e22842.
- Wilson, J.L., Heffler, L.C., Charo, J., Scheynius, A., Bejarano, M.-T., and Ljunggren, H.-G. (1999). Targeting of Human Dendritic Cells by Autologous NK Cells. *The Journal of Immunology* *163*, 6365–6370.
- Windt, D.V.D., Yazdani, H.O., Chen, H.-W., Rosborough, B.R., Loughran, P., Tsung, A., and Huang, H. (2016). ST2 Stimulation on Neutrophils Induces Neutrophil Extracellular Trap Formation and Exacerbates Injury after Hepatic Ischemia/Reperfusion. *Journal of the American College of Surgeons* *223*, S79.
- Winkler-Pickett, R., Young, H.A., Cherry, J.M., Diehl, J., Wine, J., Back, T., Bere, W.E., Mason, A.T., and Ortaldo, J.R. (2008). In Vivo Regulation of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by NK Cells: Alteration of Primary Adaptive Responses. *J Immunol* *180*, 4495–4506.
- Witzig, T.E., Vose, J.M., Zinzani, P.L., Reeder, C.B., Buckstein, R., Polikoff, J.A., Bouabdallah, R., Haioun, C., Tilly, H., Guo, P., et al. (2011). An international phase II trial of single-agent lenalidomide for relapsed or refractory aggressive B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Annals of Oncology* *22*, 1622–1627.
- Wong, C.-K., Leung, K.M.-L., Qiu, H.-N., Chow, J.Y.-S., Choi, A.O.K., and Lam, C.W.-K. (2012). Activation of eosinophils interacting with dermal fibroblasts by pruritogenic cytokine IL-31 and alarmin IL-33: implications in atopic dermatitis. *PLoS ONE* *7*, e29815.
- Wood, I.S., Wang, B., and Trayhurn, P. (2009). IL-33, a recently identified interleukin-1 gene family member, is expressed in human adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *384*, 105–109.
- Wrangle, J.M., Velcheti, V., Patel, M.R., Garrett-Mayer, E., Hill, E.G., Ravenel, J.G., Miller, J.S., Farhad, M., Anderton, K., Lindsey, K., et al. (2018). ALT-803, an IL-15 superagonist, in combination with nivolumab in patients with metastatic non-small cell lung cancer: a non-randomised, open-label, phase 1b trial. *Lancet Oncol.* *19*, 694–704.
- Wu, Z., and Zhang, H. (2016). Prognostic value of interleukin-33 in cervical cancer patients who underwent radical hysterectomy. *9*, 5466–5472.
- Wu, C.-W., Wu, Y.-G., Cheng, C., Hong, Z.-D., Shi, Z.-M., Lin, S.-Q., Li, J., He, X.-Y., and Zhu, A.-Y. (2018). Interleukin-33 Predicts Poor Prognosis and Promotes Renal Cell Carcinoma Cell Growth Through its Receptor ST2 and the JNK Signaling Pathway. *Cell. Physiol. Biochem.* *47*, 191–200.
- 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.
- Wu, L., Adams, M., Carter, T., Chen, R., Muller, G., Stirling, D., Schafer, P., and Bartlett, J.B. (2008). lenalidomide enhances natural killer cell and monocyte-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity of rituximab-treated CD20+ tumor cells. *Clin. Cancer Res.* *14*, 4650–4657.
- Wu, Y., Tian, Z., and Wei, H. (2017). Developmental and Functional Control of Natural Killer Cells by Cytokines. *Front Immunol* *8*.
- Xi, H., Katschke, K.J., Li, Y., Truong, T., Lee, W.P., Diehl, L., Rangell, L., Tao, J., Arceo, R., Eastham-Anderson, J., et al. (2016). IL-33 amplifies an innate immune response in the degenerating retina. *J. Exp. Med.* *213*, 189–207.
- Xia, J., Zhao, J., Shang, J., Li, M., Zeng, Z., Zhao, J., Wang, J., Xu, Y., and Xie, J. (2015). Increased IL-33 expression in chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* *308*, L619–L627.
- Xia, Y., Ohno, T., Nishii, N., Bhingare, A., Tachinami, H., Kashima, Y., Nagai, S., Saito, H., Nakae, S., and Azuma, M. (2019). Endogenous IL-33 exerts CD8+ T cell antitumor responses overcoming pro-tumor effects by regulatory T cells in a colon carcinoma model. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *518*, 331–336.
- Xiao, L., Cen, D., Gan, H., Sun, Y., Huang, N., Xiong, H., Jin, Q., Su, L., Liu, X., Wang, K., et al. (2019). Adoptive Transfer of NKG2D CAR mRNA-Engineered Natural Killer Cells in Colorectal Cancer Patients. *Molecular Therapy* *27*, 1114–1125.

- Xiao, P., Wan, X., Cui, B., Liu, Y., Qiu, C., Rong, J., Zheng, M., Song, Y., Chen, L., He, J., et al. (2016). Interleukin 33 in tumor microenvironment is crucial for the accumulation and function of myeloid-derived suppressor cells. *Oncoimmunology* 5, e1063772.
- Xin, H., Kikuchi, T., Andarini, S., Ohkouchi, S., Suzuki, T., Nukiwa, T., Huqun, null, Hagiwara, K., Honjo, T., and Saijo, Y. (2005). Antitumor immune response by CX3CL1 fractalkine gene transfer depends on both NK and T cells. *Eur. J. Immunol.* 35, 1371–1380.
- Xu, D., Chan, W.L., Leung, B.P., Huang, F., Wheeler, R., Piedrafita, D., Robinson, J.H., and Liew, F.Y. (1998). Selective Expression of a Stable Cell Surface Molecule on Type 2 but Not Type 1 Helper T Cells. *J Exp Med* 187, 787–794.
- Xu, D., Jiang, H.-R., Kewin, P., Li, Y., Mu, R., Fraser, A.R., Pitman, N., Kurowska-Stolarska, M., McKenzie, A.N.J., McInnes, I.B., et al. (2008). IL-33 exacerbates antigen-induced arthritis by activating mast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 10913–10918.
- Xu, D., Jiang, H.-R., Li, Y., Pushparaj, P.N., Kurowska-Stolarska, M., Leung, B.P., Mu, R., Tay, H.K., McKenzie, A.N.J., McInnes, I.B., et al. (2010). IL-33 exacerbates autoantibody-induced arthritis. *J. Immunol.* 184, 2620–2626.
- Yamada, D., Rizvi, S., Razumilava, N., Bronk, S.F., Davila, J.I., Champion, M.D., Borad, M.J., Bezerra, J.A., Chen, X., and Gores, G.J. (2015). IL-33 facilitates oncogene-induced cholangiocarcinoma in mice by an interleukin-6-sensitive mechanism. *Hepatology* 61, 1627–1642.
- Yan, J., Smyth, M.J., and Teng, M.W.L. (2018). Interleukin (IL)-12 and IL-23 and Their Conflicting Roles in Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 10.
- Yanagawa, Y., Suzuki, M., Matsumoto, M., and Togashi, H. (2011). Prostaglandin E(2) enhances IL-33 production by dendritic cells. *Immunol. Lett.* 141, 55–60.
- Yanagisawa, K., Naito, Y., Kuroiwa, K., Arai, T., Furukawa, Y., Tomizuka, H., Miura, Y., Kasahara, T., Tetsuka, T., and Tominaga, S. (1997). The expression of ST2 gene in helper T cells and the binding of ST2 protein to myeloma-derived RPMI8226 cells. *J. Biochem.* 121, 95–103.
- Yang, M., Feng, Y., Yue, C., Xu, B., Chen, L., Jiang, J., Lu, B., and Zhu, Y. (2018). Lower expression level of IL-33 is associated with poor prognosis of pulmonary adenocarcinoma. *PLOS ONE* 13, e0193428.
- Yang, Q., Li, G., Zhu, Y., Liu, L., Chen, E., Turnquist, H., Zhang, X., Finn, O.J., Chen, X., and Lu, B. (2011). IL-33 synergizes with TCR and IL-12 signaling to promote the effector function of CD8+ T cells. *European Journal of Immunology* 41, 3351–3360.
- Yang, Y., Shaffer, A.L., Emre, N.C.T., Ceribelli, M., Zhang, M., Wright, G., Xiao, W., Powell, J., Platig, J., Kohlhammer, H., et al. (2012). Exploiting synthetic lethality for the therapy of ABC diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell* 21, 723–737.
- Yang, Y., Wang, J.-B., Li, Y.-M., Zhao, Y.U., Wang, R., Wu, Q., Zheng, R.-S., and Ou, Y.-R. (2016). Role of IL-33 expression in oncogenesis and development of human hepatocellular carcinoma. *Oncol Lett* 12, 429–436.
- Yang, Z.-P., Ling, D.-Y., Xie, Y.-H., Wu, W.-X., Li, J.-R., Jiang, J., Zheng, J.-L., Fan, Y.-H., and Zhang, Y. (2015a). The Association of Serum IL-33 and sST2 with Breast Cancer. *Dis. Markers* 2015, 516895.
- Yang, Z.-P., Ling, D.-Y., Xie, Y.-H., Wu, W.-X., Li, J.-R., Jiang, J., Zheng, J.-L., Fan, Y.-H., and Zhang, Y. (2015b). The Association of Serum IL-33 and sST2 with Breast Cancer. *Dis. Markers* 2015, 516895.
- Yannam, G.R., Gutti, T., and Poluektova, L.Y. (2012). IL-23 in Infections, Inflammation, Autoimmunity and Cancer: Possible Role in HIV-1 and AIDS. *J Neuroimmune Pharmacol* 7, 95–112.
- Yasuda, K., Muto, T., Kawagoe, T., Matsumoto, M., Sasaki, Y., Matsushita, K., Taki, Y., Futatsugi-Yumikura, S., Tsutsui, H., Ishii, K.J., et al. (2012). Contribution of IL-33-activated type II innate lymphoid cells to pulmonary eosinophilia in intestinal nematode-infected mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 3451–3456.
- Yin, H., Li, X.-Y., Jin, X.-B., Zhang, B.-B., Gong, Q., Yang, H., Zheng, F., Gong, F.-L., and Zhu, J.-Y. (2010). IL-33 prolongs murine cardiac allograft survival through induction of TH2-type immune deviation. *Transplantation* 89, 1189–1197.
- Yin, J., Leavenworth, J.W., Li, Y., Luo, Q., Xie, H., Liu, X., Huang, S., Yan, H., Fu, Z., Zhang, L.Y., et al. (2015). Ezh2 regulates differentiation and function of natural killer cells through histone methyltransferase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, 15988–15993.
- Yokoyama, W.M., and Kim, S. (2006). Licensing of natural killer cells by self-major histocompatibility complex class I. *Immunol. Rev.* 214, 143–154.
- Yoneda, O., Imai, T., Goda, S., Inoue, H., Yamauchi, A., Okazaki, T., Imai, H., Yoshie, O., Bloom, E.T., Domae, N., et al. (2000). Fractalkine-Mediated Endothelial Cell Injury by NK Cells. *The Journal of Immunology* 164, 4055–4062.
- Yoshimoto, T., Yasuda, K., Tanaka, H., Nakahira, M., Imai, Y., Fujimori, Y., and Nakanishi, K. (2009). Basophils contribute to T H 2-IgE responses in vivo via IL-4 production and presentation of peptide–MHC class II complexes to CD4+ T cells. *Nature Immunology* 10, 706–712.

- Yost, K.E., Satpathy, A.T., Wells, D.K., Qi, Y., Wang, C., Kageyama, R., McNamara, K.L., Granja, J.M., Sarin, K.Y., Brown, R.A., et al. (2019). Clonal replacement of tumor-specific T cells following PD-1 blockade. *Nat. Med.* *25*, 1251–1259.
- Yu, G., Xu, X., Vu, M.D., Kilpatrick, E.D., and Li, X.C. (2006a). NK cells promote transplant tolerance by killing donor antigen-presenting cells. *J. Exp. Med.* *203*, 1851–1858.
- Yu, H., Fehniger, T.A., Fuchshuber, P., Thiel, K.S., Vivier, E., Carson, W.E., and Caligiuri, M.A. (1998). Flt3 ligand promotes the generation of a distinct CD34(+) human natural killer cell progenitor that responds to interleukin-15. *Blood* *92*, 3647–3657.
- Yu, J., Wei, M., Becknell, B., Trotta, R., Liu, S., Boyd, Z., Jaung, M.S., Blaser, B.W., Sun, J., Benson, D.M., et al. (2006b). Pro- and antiinflammatory cytokine signaling: reciprocal antagonism regulates interferon-gamma production by human natural killer cells. *Immunity* *24*, 575–590.
- Yu, J., Heller, G., Cheung, J., Kim, S., Yokoyama, W.M., and Hsu, K.C. (2007a). Hierarchy of the human natural killer cell response is determined by class and quantity of inhibitory receptors for self-HLA-B and HLA-C ligands. *J. Immunol.* *179*, 5977–5989.
- Yu, J., Mao, H.C., Wei, M., Hughes, T., Zhang, J., Park, I., Liu, S., McClory, S., Marcucci, G., Trotta, R., et al. (2010). CD94 surface density identifies a functional intermediary between the CD56bright and CD56dim human NK-cell subsets. *Blood* *115*, 274–281.
- Yu, J., Freud, A.G., and Caligiuri, M.A. (2013). Location and cellular stages of natural killer cell development. *Trends in Immunology* *34*, 573–582.
- Yu, X.-X., Hu, Z., Shen, X., Dong, L.-Y., Zhou, W.-Z., and Hu, W.-H. (2015). IL-33 Promotes Gastric Cancer Cell Invasion and Migration Via ST2–ERK1/2 Pathway. *Dig Dis Sci* *60*, 1265–1272.
- Yu, Y.-R.A., Fong, A.M., Combadiere, C., Gao, J.-L., Murphy, P.M., and Patel, D.D. (2007b). Defective antitumor responses in CX3CR1-deficient mice. *Int. J. Cancer* *121*, 316–322.
- Zaiss, D.M.W., Gause, W.C., Osborne, L.C., and Artis, D. (2015). Emerging functions of amphiregulin in orchestrating immunity, inflammation, and tissue repair. *Immunity* *42*, 216–226.
- Zanoni, I., Spreafico, R., Bodio, C., Di Gioia, M., Cigni, C., Broggi, A., Gorletta, T., Caccia, M., Chirico, G., Sironi, L., et al. (2013). IL-15 cis presentation is required for optimal NK cell activation in lipopolysaccharide-mediated inflammatory conditions. *Cell Rep* *4*, 1235–1249.
- Zemek, R.M., Jong, E.D., Chin, W.L., Schuster, I.S., Fear, V.S., Casey, T.H., Forbes, C., Dart, S.J., Leslie, C., Zaitouny, A., et al. (2019). Sensitization to immune checkpoint blockade through activation of a STAT1/NK axis in the tumor microenvironment. *Science Translational Medicine* *11*.
- Zeng, X., Zhang, Z., Gao, Q.-Q., Wang, Y.-Y., Yu, X.-Z., Zhou, B., and Xi, M.-R. (2016). Clinical Significance of Serum Interleukin-31 and Interleukin-33 Levels in Patients of Endometrial Cancer: A Case Control Study. *Dis. Markers* *2016*, 9262919.
- Zhang, H.-F., Xie, S.-L., Chen, Y.-X., Mai, J.-T., Wang, J.-F., Zhu, W.-L., and Zhu, L.-G. (2012a). Altered serum levels of IL-33 in patients with advanced systolic chronic heart failure: correlation with oxidative stress. *J Transl Med* *10*, 1–11.
- Zhang, J., Scordi, I., Smyth, M.J., and Lichtenheld, M.G. (1999). Interleukin 2 receptor signaling regulates the perforin gene through signal transducer and activator of transcription (Stat)5 activation of two enhancers. *J. Exp. Med.* *190*, 1297–1308.
- Zhang, J., Wang, P., Ji, W., Ding, Y., and Lu, X. (2017a). Overexpression of interleukin-33 is associated with poor prognosis of patients with glioma. *International Journal of Neuroscience* *127*, 210–217.
- 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.
- Zhang, L., Lu, R., Zhao, G., Pflugfelder, S.C., and Li, D.-Q. (2011). TLR-mediated induction of pro-allergic cytokine IL-33 in ocular mucosal epithelium. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* *43*, 1383–1391.
- Zhang, L.-H., Kosek, J., Wang, M., Heise, C., Schafer, P.H., and Chopra, R. (2013). Lenalidomide efficacy in activated B-cell-like subtype diffuse large B-cell lymphoma is dependent upon IRF4 and cereblon expression. *Br. J. Haematol.* *160*, 487–502.
- Zhang, M., Ju, W., Yao, Z., Yu, P., Wei, B.-R., Simpson, R.M., Waitz, R., Fassò, M., Allison, J.P., and Waldmann, T.A. (2012b). Augmented IL-15 α Expression by CD40 Activation Is Critical in Synergistic CD8 T Cell-Mediated Antitumor Activity of Anti-CD40 Antibody with IL-15 in TRAMP-C2 Tumors in Mice. *The Journal of Immunology* *188*, 6156–6164.
- Zhang, P., Liu, X.-K., Chu, Z., Ye, J.C., Li, K.-L., Zhuang, W.-L., Yang, D.-J., and Jiang, Y.-F. (2012c). Detection of interleukin-33 in serum and carcinoma tissue from patients with hepatocellular carcinoma and its clinical implications. *J. Int. Med. Res.* *40*, 1654–1661.
- Zhang, Q., Putheti, P., Zhou, Q., Liu, Q., and Gao, W. (2008). Structures and biological functions of IL-31 and IL-31 receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* *19*, 347–356.

- 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. *Nature Immunology* *19*, 723–732.
- Zhang, Y., Davis, C., Shah, S., Hughes, D., Ryan, J.C., Altomare, D., and Peña, M.M.O. (2017b). IL-33 promotes growth and liver metastasis of colorectal cancer in mice by remodeling the tumor microenvironment and inducing angiogenesis. *Mol. Carcinog.* *56*, 272–287.
- Zhang, Y.-J., Zhang, Q., Yang, G.-J., Tao, J.-H., Wu, G.-C., Huang, X.-L., Duan, Y., Li, X.-P., Ye, D.-Q., and Wang, J. (2018c). Elevated serum levels of interleukin-1 β and interleukin-33 in patients with systemic sclerosis in Chinese population. *Z Rheumatol* *77*, 151–159.
- Zheng, X., Qian, Y., Fu, B., Jiao, D., Jiang, Y., Chen, P., Shen, Y., Zhang, H., Sun, R., Tian, Z., et al. (2019). Mitochondrial fragmentation limits NK cell-based tumor immunosurveillance. *Nat. Immunol.* *20*, 1656–1667.
- Zhou, Q., Wu, X., Wang, X., Yu, Z., Pan, T., Li, Z., Chang, X., Jin, Z., Li, J., Zhu, Z., et al. (2020). The reciprocal interaction between tumor cells and activated fibroblasts mediated by TNF- α /IL-33/ST2L signaling promotes gastric cancer metastasis. *Oncogene* *39*, 1414–1428.
- Zhou, X., Yu, S., Zhao, D.-M., Harty, J.T., Badovinac, V.P., and Xue, H.-H. (2010). Differentiation and persistence of memory CD8(+) T cells depend on T cell factor 1. *Immunity* *33*, 229–240.
- Zhu, C., Anderson, A.C., Schubart, A., Xiong, H., Imitola, J., Khoury, S.J., Zheng, X.X., Strom, T.B., and Kuchroo, V.K. (2005). The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat. Immunol.* *6*, 1245–1252.
- 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.
- Ziblat, A., Domaica, C.I., Spallanzani, R.G., Iraolagoitia, X.L.R., Rossi, L.E., Avila, D.E., Torres, N.I., Fuertes, M.B., and Zwirner, N.W. (2015). IL-27 stimulates human NK-cell effector functions and primes NK cells for IL-18 responsiveness. *Eur. J. Immunol.* *45*, 192–202.
- Ziblat, A., Nuñez, S.Y., Iraolagoitia, X.L.R., Spallanzani, R.G., Torres, N.I., Sierra, J.M., Secchiari, F., Domaica, C.I., Fuertes, M.B., and Zwirner, N.W. (2017). Interleukin (IL)-23 Stimulates IFN- γ Secretion by CD56bright Natural Killer Cells and Enhances IL-18-Driven Dendritic Cells Activation. *Frontiers in Immunology* *8*.
- Ziblat, A., Nuñez, S.Y., Raffo Iraolagoitia, X.L., Spallanzani, R.G., Torres, N.I., Sierra, J.M., Secchiari, F., Domaica, C.I., Fuertes, M.B., and Zwirner, N.W. (2018). Interleukin (IL)-23 Stimulates IFN- γ Secretion by CD56bright Natural Killer Cells and Enhances IL-18-Driven Dendritic Cells Activation. *Front Immunol* *8*.
- Ziegler, H.W., Kay, N.E., and Zarlign, J.M. (1981). Deficiency of natural killer cell activity in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Int. J. Cancer* *27*, 321–327.
- Zilionis, R., Engblom, C., Pfirschke, C., Savova, V., Zemmour, D., Saatcioglu, H.D., Krishnan, I., Maroni, G., Meyerovitz, C.V., Kerwin, C.M., et al. (2019). Single-Cell Transcriptomics of Human and Mouse Lung Cancers Reveals Conserved Myeloid Populations across Individuals and Species. *Immunity* *50*, 1317–1334.e10.
- Zinzani, P.L., Vose, J.M., Czuczman, M.S., Reeder, C.B., Haioun, C., Polikoff, J., Tilly, H., Zhang, L., Prandi, K., Li, J., et al. (2013). Long-term follow-up of lenalidomide in relapsed/refractory mantle cell lymphoma: subset analysis of the NHL-003 study. *Ann. Oncol.* *24*, 2892–2897.
- Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2014). CD103+ dendritic cells producing interleukin-12 in anticancer immunosurveillance. *Cancer Cell* *26*, 591–593.
- Zitvogel, L., Rusakiewicz, S., Routy, B., Ayyoub, M., and Kroemer, G. (2016). Immunological off-target effects of imatinib. *Nat Rev Clin Oncol* *13*, 431–446.
- Zocchi, M.R., Catellani, S., Canevali, P., Tavella, S., Garuti, A., Villaggio, B., Zunino, A., Gobbi, M., Fraternali-Orcioni, G., Kunkl, A., et al. (2012). High ERp5/ADAM10 expression in lymph node microenvironment and impaired NKG2D ligands recognition in Hodgkin lymphomas. *Blood* *119*, 1479–1489.

Annexes



Inflammasome Deletion Promotes Anti-tumor NK Cell Function in an IL-1/IL-18 Independent Way in Murine Invasive Breast Cancer

OPEN ACCESS

Edited by:

Francois Ghiringhelli,
Institut National de la Santé et de la
Recherche Médicale
(INSERM), France

Reviewed by:

Limagne Emeric,
Centre Georges François
Leclerc, France
Frederique Vegran,
INSERM U1231 Lipides, Nutrition,
Cancer (LNC), France
Antonino Bruno,
MultiMedica (IRCCS), Italy

*Correspondence:

Virginie Petrilli
virginie.petrilli@lyon.unicancer.fr

† Present address:

Baptiste Guey,
Global Health Institute, École
Polytechnique Fédérale de Lausanne,
Lausanne, Switzerland
Isabelle Puisieux,
Institut Curie, Research Center U932
26, rue d'ULM 75248, Paris, France

Specialty section:

This article was submitted to
Cancer Immunity and Immunotherapy,
a section of the journal
Frontiers in Oncology

Received: 22 May 2020

Accepted: 29 July 2020

Published: 16 September 2020

Citation:

Guey B, Bodnar-Wachtel M,
Drouillard A, Eberhardt A, Pratiel M,
Goutagny N, Bendriss-Vermare N,
Puisieux I, Caux C, Walzer T and
Petrilli V (2020) Inflammasome
Deletion Promotes Anti-tumor NK Cell
Function in an IL-1/IL-18 Independent
Way in Murine Invasive Breast Cancer.
Front. Oncol. 10:1683.
doi: 10.3389/fonc.2020.01683

Baptiste Guey^{1†}, **Mélanie Bodnar-Wachtel**¹, **Annabelle Drouillard**², **Anaïs Eberhardt**¹, **Manon Pratiel**¹, **Nadège Goutagny**¹, **Nathalie Bendriss-Vermare**¹, **Isabelle Puisieux**^{1†}, **Christophe Caux**¹, **Thierry Walzer**² and **Virginie Petrilli**^{1*}

¹ Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, INSERM U1052, CNRS UMR5286, Université de Lyon, Université Lyon 1, Centre Léon Bérard, Lyon, France, ² Centre International de Recherche en Infectiologie, INSERM U1111 – CNRS UMR5308, Université de Lyon, ENS de Lyon, Université Lyon 1, Lyon, France

Inflammasomes are molecular complexes that trigger an inflammatory response upon detection of pathogens or danger signals. Recent studies suggest that they are also involved in cancer progression. However, their roles during tumorigenesis remain poorly understood and controversial. Here, we investigated whether inflammasome activation supports mammary tumor growth. Using mouse models of invasive breast cancer, our results demonstrate that the absence of a functional inflammasome impairs tumor growth. Importantly, tumors implanted into inflammasome-deficient mice recruited significantly less neutrophils and more natural killer (NK) cells, and these latter cells displayed a more active phenotype. Interestingly, NK cell depletion abolished the anti-tumoral effect observed in inflammasome-deficient mice, although inflammasome-regulated cytokine neutralization had no effect. Thus, our work identifies a novel role for the inflammasome in supporting mammary tumor growth by attenuating NK cell recruitment and activity. These results suggest that inflammasome inhibition could be a putative target for treating invasive breast cancers.

Keywords: inflammasome, breast cancer, NK cells, inflammation, Caspase-1, ASC

INTRODUCTION

Breast cancers are often infiltrated with immune cells that have pro- or anti-tumoral functions (1, 2). The composition of the immune infiltrate and the level of infiltration have been correlated with patient prognosis in several types of cancers (3–7). Chronic inflammation taking place within tumors can promote tumor progression by stimulating angiogenesis or inhibiting anti-tumoral immunity (8, 9).

Within injured tissues, innate immune cells sense pathogen- or danger-associated molecular patterns (PAMPs, DAMPs) using germline-encoded pattern recognition receptors (PRRs) that drive inflammation to restore homeostasis. Among these PRRs, specific NOD-like receptors (NLRs, such as NLRP3) and hematopoietic interferon-inducible nuclear antigens with 200 amino acid repeats (HIN200) protein families, operate by forming multiprotein complexes named inflammasomes.

Besides PRRs, inflammasomes are composed of the adaptor protein associated speck-like containing a CARD protein (ASC) and of the cysteine protease caspase-1 (10). Once activated within the inflammasome complex, caspase-1 cleaves and activates two major pro-inflammatory cytokines namely the pro-IL-1 β and the pro-IL-18, and drives an inflammatory cell death known as pyroptosis through gasdermin D cleavage (11, 12).

In the context of cancer, the role of the inflammasome is complex as it can both promote anti- and pro-tumoral responses. For instance, *Nlrp3*-, *Nlr4*-, and *Caspase-1*-deficient mice are more sensitive to colorectal cancer induced by DSS-AOM treatment, suggesting an anti-tumoral role for the inflammasome in the gut (13–15). This protective role is mediated by the production of IL-18, which is involved in maintaining the intestinal epithelial barrier integrity. Conversely, IL-18 is a critical driver of immune suppression in a model of multiple myeloma, in which it fuels the development of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) (16). Moreover, the NLRP3 inflammasome was shown to promote tumor growth in models of carcinogen-induced sarcoma and skin papilloma through the release of IL-1 β (17, 18). Thus, inflammasome activation may dampen or promote anti-tumor responses depending on the tumor type, the stage of tumorigenesis and the model studied. This intricacy is reinforced by the wide range of expression of some inflammasome components in immune and non-hematopoietic cells. For instance, in a carcinogen-induced skin cancer model, ASC depletion in keratinocytes facilitates tumor development, whereas its loss in myeloid cells impairs it (19).

With respect to breast cancer, the presence of IL-1 β within the tumor microenvironment is frequently associated with poor prognosis, suggesting a pro-tumoral role for this cytokine (20–24). For instance, in the MMTV-Neu^{V664E} BALB/c model, the invasive conversion of the mammary tumors was associated with an upregulation of the IL-1 β transcriptional signature (25). In the 4T1 murine model, which is used as a preclinical model for invasive breast cancer, IL-1 β promotes tumor growth and the capacity of cells to metastasize (26, 27). Yet, the role of inflammasomes is not limited to IL-1 β production and the overall impact of this pathway in the anti-breast cancer response remains unclear. We thus tested whether the inflammasome supports invasive breast cancer development *in vivo* by using mice deficient in major inflammasome components.

MATERIALS AND METHODS

Mouse Tumor Cell Lines

4T1 and YAC-1 cells were cultured in RPMI medium supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated FBS (Life technologies), 1% (v/v) penicillin/streptomycin, 1% (v/v) L-glutamine, and 25 μ M 2-mercaptoethanol (only 4T1 cells) at 37°C in a 5% CO₂ incubator. 4T1 cells were proven to be mycoplasma-free (MycAlert Mycoplasma detection kit, Lonza) before each injection and experiment. Cells were also proven to be free of mouse infectious agents by Taqman[®] PCR testing of mouse essential panel (Charles River).

Mice

Nlrp3 knockout (KO) mice were obtained from J. Tschopp (28), *Asc* KO mice from V. M. Dixit (29), and *Caspase-1/Caspase-11* KO mice referred as *Caspase-1* KO in the text from R. A. Flavell (30). MMTV-Neu^{V664E} in the BALB/c from F Cavallo (31). The three transgenic KO strains were backcrossed with a BALB/c/Ola (Harlan strain) background for at least nine generations. WT animals were littermates of the *Caspase-1/Caspase-11* knockout, *Asc* knockout, or *Nlrp3* knockout colonies or imported from Harlan and maintained in the same cages as KO animals. Animals were housed in individually ventilated cages under specific pathogen-free conditions, fed with Harlan Teklad food pellets and studies were conducted in accordance with the regulations for animals used for scientific purposes governed by the European Directive 2010/63/EU. Protocols were validated by the local Animal Ethic Evaluation Committee (CECCAPP: C2EA-15, Comité d'Evaluation Commun au PBES, à AniCan, au laboratoire P4, à l'animalerie de transit de l'ENS, à l'animalerie de l'IGFL, au PRECI, à l'animalerie du Cours Albert Thomas, au CARRTEL INRA Thonon-les-Bains et à l'animalerie de transit de l'IBCP, CLB-2013-019, CLB-2015-015) and authorized by the French Ministry of Education and Research.

Bone Marrow Mouse Chimera

Five-week-old mice received antibiotics 2 days prior to being exposed to 6 Gy g-irradiations. The day of irradiation, bone marrow (BM) was flushed with 5 mL of RPMI from the hind legs of mice and CD3⁺ cells were depleted using the CD3 MicroBead Kit (Miltenyi biotec). 10⁶ BM cells in PBS supplemented with 0.1% penicillin/streptomycin were re-injected intravenously (I.V.). Recipient animals recovered for 4 weeks before tumor injection.

Tumor Growth Assays

Only virgin female BALB/c/Ola mice aged 7 to 10 weeks were used for *in vivo* experiments. 20,000 4T1 tumor cells in 100 μ L of sterile PBS were injected orthotopically into the 4th mammary fat pad. Primary tumor growth was monitored with a digital caliper measurement and expressed as a tumor volume (ellipsoidal formula, $\pi/6 \times \text{length} \times \text{width}^2$). Mice were sacrificed when tumor size reached 1,200 mm³.

MMTV-Neu^{V664E} mice were monitored over time for tumor appearance through palpation (\sim 100 mm³).

Cell Suspensions From Spleens or Tumors

Spleens isolated from mice were crushed and filtered through a 40- μ m filter and resuspended in FACS buffer (PBS supplemented with 5% (vol/vol) FBS, 2 mM EDTA). Red blood cells were lysed in 5 mL of erythrocyte lysis buffer (155 mM NH₄Cl, 12 mM NaHCO₃, 0.1 mM EDTA) for 5 min. After a PBS wash, cells were then resuspended in FACS buffer.

Seven or 14 days post-injection of 4T1 cells, tumors isolated from mice were cut into small pieces and incubated with 5 mL of DMEM supplemented with DNase 0.02 mg/mL (Sigma D4513)—Collagenase 1 mg/mL (Sigma C2674) for 30 min at 37°C. Digested tumors were then filtered through a 40- μ m filter and re-suspended in FACS buffer and filtered again twice. Red

blood cells were lysed in 5 mL of erythrocyte lysis buffer for 5 min. After a PBS wash, cells were then resuspended in FACS buffer.

Flow Cytometry

Cell suspensions from spleens or from tumors were washed in FACS buffer (PBS supplemented with 2 mM EDTA and 5% (vol/vol) FBS) and incubated for 5 min with purified anti-mouse CD16/32 FcBlocks (93; Biolegend). Cells were stained with fluorochrome-conjugated antibodies (**Supplementary Table 1**) at 4°C for 20 min LIVE/DEAD™ Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit, 405 nm excitation (Invitrogen L34965) was used to gate on live cells. For cell surface staining, cells were washed twice in FACS buffer, fixed in PBS 2% paraformaldehyde and stored in FACS buffer before analysis. For intracellular staining, cells were fixed/permeabilized with the Cytotfix/Cytoperm kit (554714, BD Bioscience) for 20 min on ice. Cells were washed with PermWash buffer and stained with fluorochrome-conjugated antibodies diluted (**Supplementary Table 1**) in PermWash buffer for 30 min on ice. Cells were washed again in PermWash buffer and kept at 4°C before analysis. Data were collected on a LSR II Fortessa (BD Bioscience) and analyzed using the FlowJo software.

Luminex Assay

Tumors were prepared as described above. Digested tumors were centrifuged and supernatants were used for luminex assay according to manufacturer protocol (mouse pre-mixed multianalyte test reference LXAMSM-18 R&Dsystems).

NK Cell Depletion

Mice were injected I.V. (in the retro-orbital sinus) with 50 µL of the Ultra-LEAF™ Purified anti-Asialo-GM1 (clone: Poly21460, Biolegend) antibody 1 day prior to tumor cell injection. In order to maintain NK cell depletion during tumor growth, mice were injected I.V. every 10 days.

NK Cell Activation

3.10^6 splenic lymphocytes or tumor cell suspensions were prepared in complete medium (RPMI + glutamax, 10% SVE, 1% penicillin/streptomycin, 10 mM HEPES, 1 mM sodium-pyruvate, 50 µM 2-mercaptoethanol) and incubated for 4 h with cytokines [recombinant mouse IL-12 (Peprotech, 200-12) (final concentration: 100 ng/mL) and recombinant mouse IL-18 (R&D, B004-5) (final concentration: 20 ng/mL)] or on antibody-coated plates [anti-NKp46 (29A1; BD Biosciences), anti-Ly49D (4E5; BD Biosciences), anti-NKG2D (CX5; BD Biosciences), and GolgiStop (BD Biosciences) in the presence of anti-CD107a (2B6; BD Biosciences)] or co-cultured with Yac-1 or 4T1 cells (1:1 ratio).

In vivo Cytokine Depletion

Mice were injected intraperitoneally (I.P.) with 2.5 mg/kg of body weight (B.W.) of anti-IL-1β antibody (Clone B122, Biolegend, 503504), or 0.25 mg/kg of B.W. IL-18 binding protein (IL-18BPd-FC) (R&D systems, 122-BP), or both, or control IgG 1 day prior to the tumor cell injection and every 3 days after that. Anakinra (Kineret®) was administered I.P. (20 mg/kg of B.W.) prior to tumor cell inoculation and every 2 days after that. The second anti-IL-1b (AF-401-NA; R&D Systems) or control isotype was

injected i.p. at a dose of 10 µg per mouse twice a week as described in (32).

Statistical Analysis

Statistical analysis of each experiment was conducted using the GraphPad Prism software. One-way or two-way ANOVA were used followed by Bonferroni's *Post-test* to compare tumor progression and immune cell infiltration.

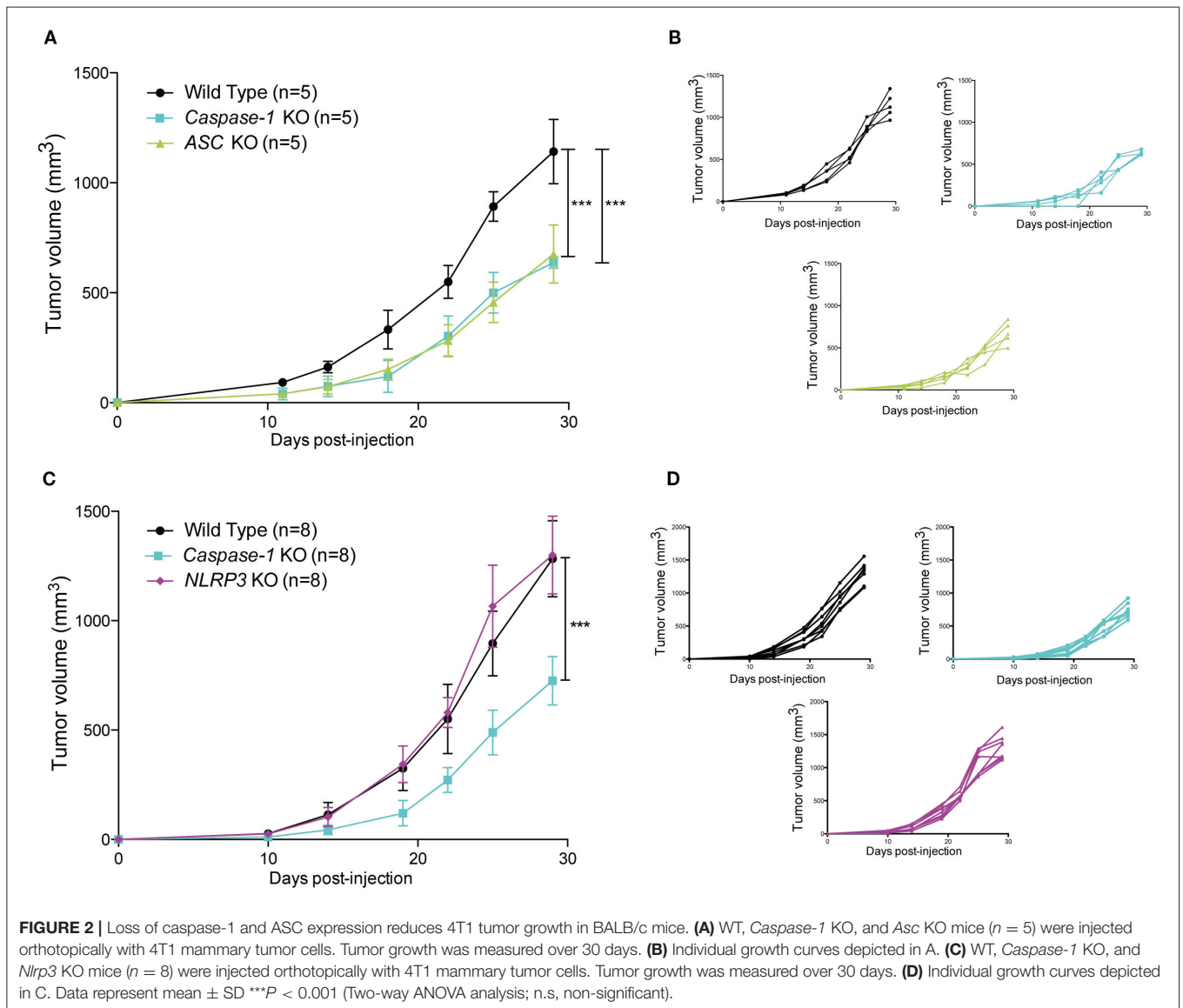
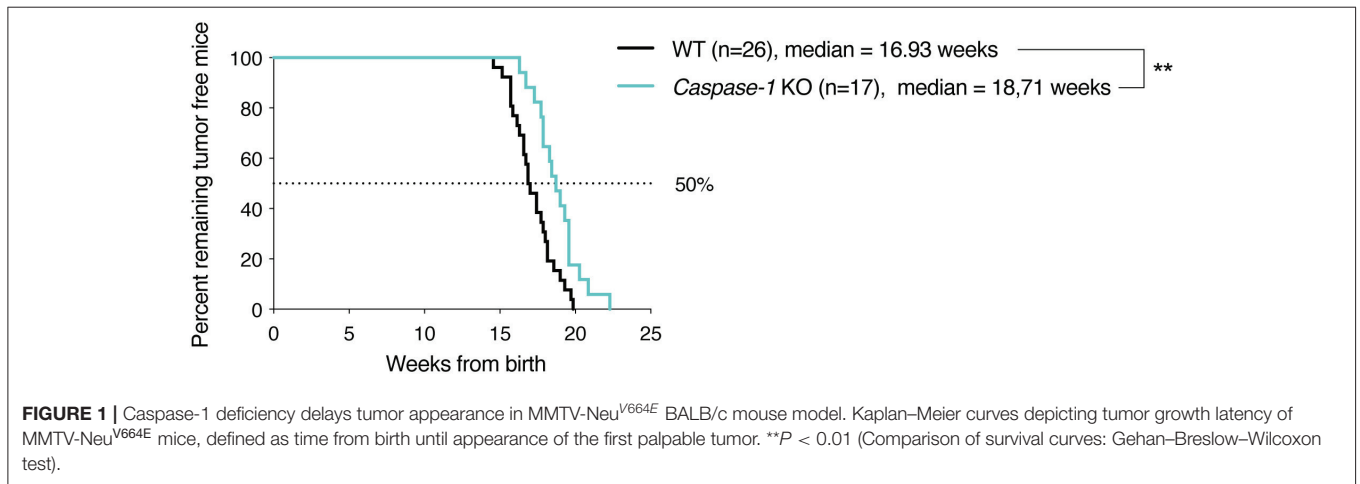
RESULTS

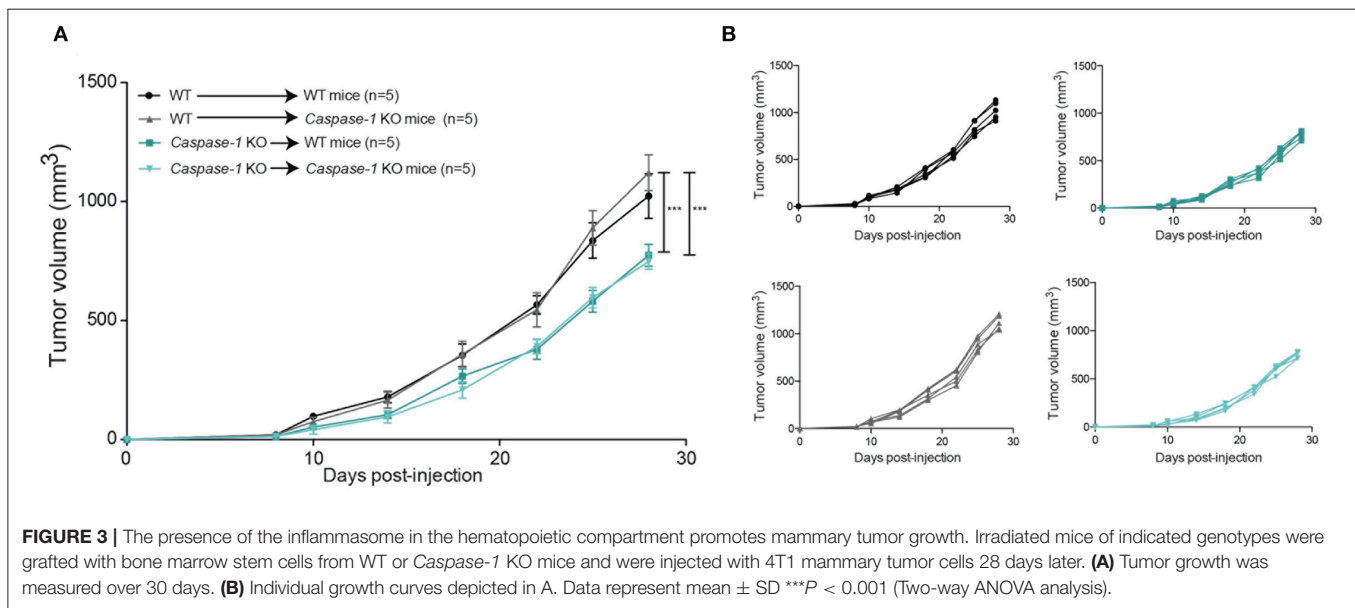
The Absence of a Functional Inflammasome Impairs Mammary Tumor Growth in Mice

To assess the impact of the inflammasome on mammary cancer progression *in vivo*, MMTV-Neu^{V664E} mice were bred with *Caspase-1* knock-out (KO) mice, the main inflammasome effector, and the number of tumor-free mice was monitored over time. As shown in the **Figure 1**, the absence of caspase-1 significantly delayed tumor onset in mice suggesting a protumoral role for the inflammasome. The difference in the age of onset was however, modest and could be due to the fact that caspase-1 is well-expressed in different tissues including mammary cells and could display opposite functions as described above for ASC (19). We thus decided to use syngeneic 4T1 carcinoma cells to explore the effect of the presence of the inflammasome within the tumor microenvironment on tumor progression. The cells were injected into the mammary fat pad of WT, *Caspase-1* KO and *Asc* KO BALB/c mice, respectively, and tumor growth was monitored over time. While inoculation of female WT BALB/c mice with cancer cells gave rise to large tumors within 30 days, the absence of caspase-1 or ASC resulted in significantly smaller tumors (**Figures 2A,B**), suggesting that inflammasomes likely support mammary tumor growth. To ascertain whether NLRP3 was also involved, we compared 4T1 cell growth in *Nlrp3*-deficient and *Nlrp3*-sufficient WT mice. Indeed, NLRP3 appeared to be a good candidate as this receptor is well-described to sense DAMPs, such as ATP or uric acid released by necrotic cells, and since necrosis of tumor cells is frequent during cancer progression (33, 34). As shown in **Figures 2C,D**, tumor sizes were similar between WT and *Nlrp3* KO mice, indicating that NLRP3 does not support mammary tumor growth *in vivo*, unlike caspase-1 and ASC.

Inflammasome Expression in the Hematopoietic Compartment Supports Tumor Growth

As previously mentioned, caspase-1 is the main catalytic subunit of the inflammasome. Its expression is not restricted to immune cells as it is also expressed by many non-hematopoietic cell types such as epithelial cells or adipocytes (35, 36). To evaluate the role of inflammasome components in tumor growth in immune vs. non-immune cells, we first generated a series of bone marrow chimeric mice to obtain different combinations of caspase-1 expression in immune and non-immune cells as indicated in **Figure 3A**. Thirty days post reconstitution, mice





were inoculated with 4T1 cells and tumor growth was monitored. The growth rate of 4T1 cells was determined by the expression of caspase-1 in immune cells, and independent of its expression in non-immune cells, as illustrated in **Figures 3A,B** in recipient mice with different genotypes. Thus, the absence of caspase-1 in the hematopoietic cell lineage is responsible for the delay in tumor growth, suggesting that caspase-1-expressing immune cells support cancer progression.

The Inflammasome Impairs NK Cell Recruitment to the Tumor

Activation of the inflammasome has been shown to modulate the composition of the tumor immune infiltrate (37). To address this finding in our model, we analyzed the tumor immune infiltrate in the mammary gland at days 7 and 14 post-injection in WT, *Asc*⁻, and *Caspase-1*-deficient mice. Different myeloid and lymphoid cell subtypes were studied by flow cytometry.

With respect to the myeloid compartment, our analysis of the CD45⁺ infiltrate showed that the frequency of neutrophils (defined as Ly6C^{int}-Ly6G^{high}) was significantly decreased at both time points in *Caspase-1*- or *Asc*-deficient mice compared to control mice, while the abundance of monocytes, macrophages, dendritic cells (DC) and eosinophils was similar in all mouse groups (**Figures 4A,B** and **Supplementary Figures 1A,C**).

Regarding lymphoid cells, no significant difference in CD4⁺ or CD8⁺ T lymphocyte recruitment was observed between WT and inflammasome-deficient mice at day 7 and day 14 post-injection and very few B cells had infiltrated the tumors (**Figures 4C,D** and **Supplementary Figure 1D**). However, the frequency of infiltrating NK cells (Nkp46⁺ cells) was significantly higher in tumors implanted in *Caspase-1* and *Asc* KO mice compared with WT mice at day 7 and day 14 (**Figures 4C,D** and **Supplementary Figure 1B**). Differences in tumor infiltrates between the groups of mice were not due to pre-existing differences in these mice, as the immune composition of

the spleen of tumor-bearing mice was similar in WT, *Asc*, and *Caspase-1* KO mice at day 14 (**Supplementary Figures 1E,F**).

Inhibition of Inflammasome-Regulated Cytokine Production Does Not Affect the Rate of Tumor Growth

The inflammasome controls the production of IL-1 β and IL-18 and both cytokines are involved in tumor development or control. We wondered whether blocking IL-1 β and IL-18 would impact the ability of 4T1 cells to grow in WT mice. Surprisingly, treatment with either the anti-IL-1 β antibodies or the IL-18 binding protein (BP) or both did not affect the rate of tumor growth (**Figure 5A**, **Supplementary Figure 2**). Similarly, Anakinra (recombinant IL-1Ra) injection did not delay tumor growth in WT mice, suggesting that inflammasome-regulated cytokines are not essential for controlling 4T1 cell growth *in vivo* (**Figure 5B**) (24, 32, 38). Finally, cytokine measurement using multiplex technology of tumor supernatants at day 14 showed no difference in the amount of IL-1 β , IL-33, CCL3/MIP1 α , KC or β -FGF, between WT and *Caspase-1* KO, while CCL5/RANTES was significantly increased in *Caspase-1* KO (**Supplementary Figure 3**).

Caspase-1 Deficiency Improves NK Cell Anti-tumor Activity

Since NK cells, which are important anti-tumor effectors (39, 40), were preferentially recruited into the tumors of inflammasome-deficient mice, and since increased levels of CCL5 within the tumor microenvironment were detected, we tested whether NK cells were responsible for the reduction in tumor growth. *Caspase-1* KO and WT mice were depleted of NK cells by I.V. injection of the anti-Asialo GM1 antibody before being inoculated with 4T1 cells. Upon NK cell depletion, tumors grew at the same rate in both groups of mice, demonstrating

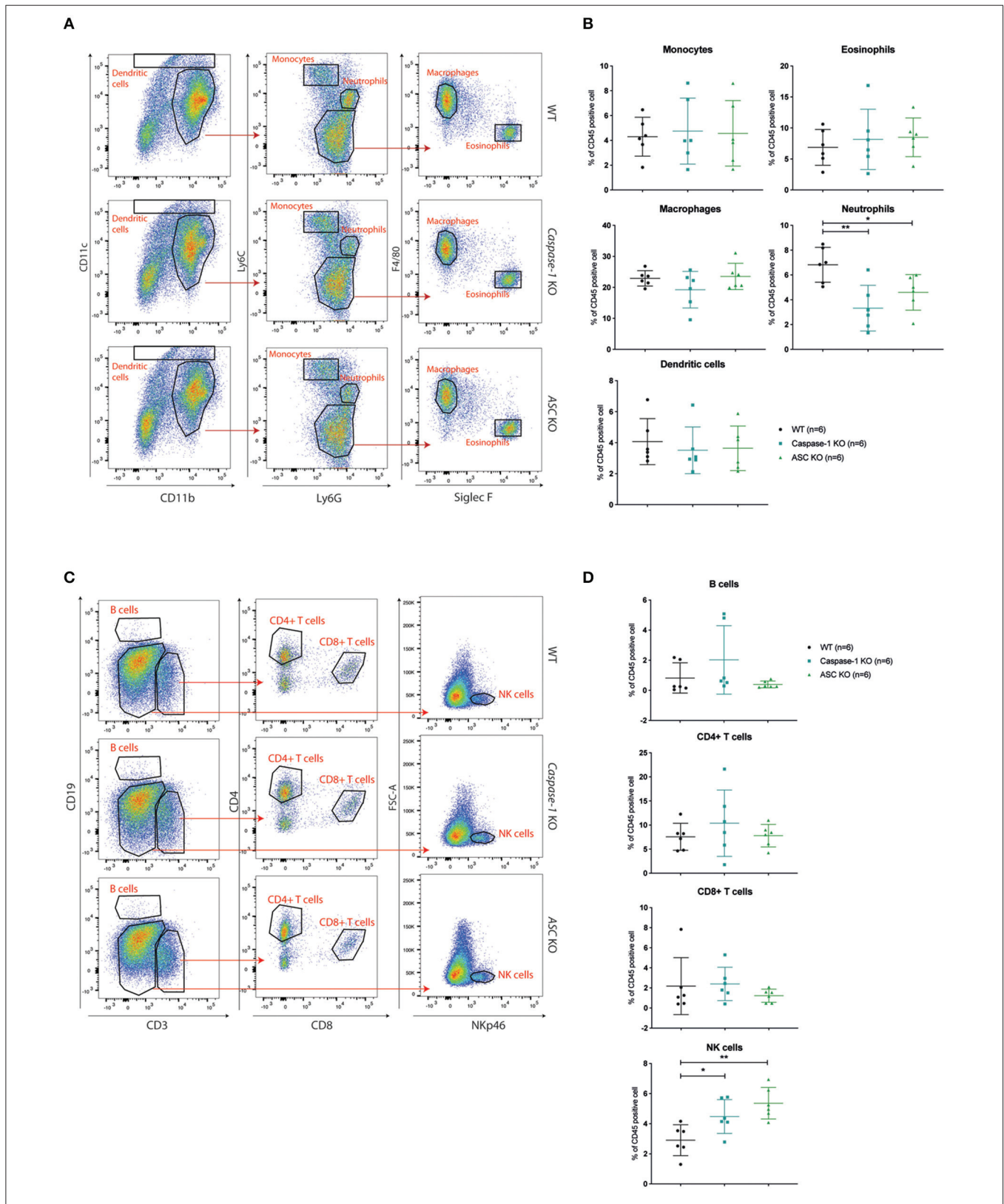
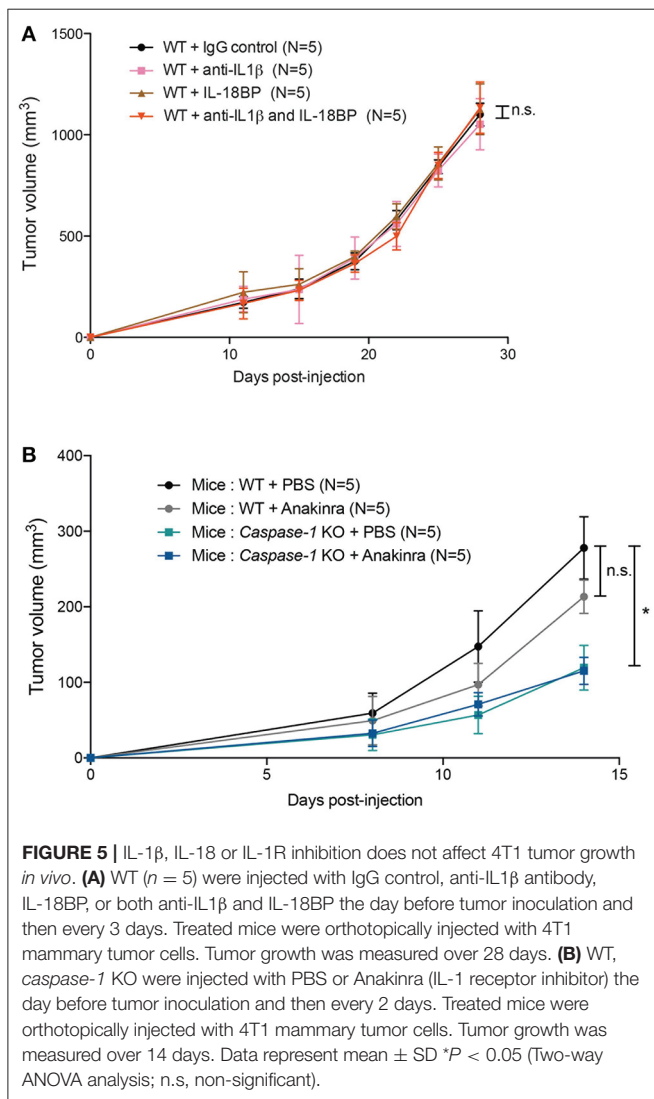


FIGURE 4 | Caspase-1 or ASC deficiency improves NK cell recruitment 14 days post-injection. **(A)** Flow cytometry analysis of myeloid cell populations in 4T1 tumors at day 14 post-injection from WT ($n = 6$), *Caspase-1* KO ($n = 6$), and ASC KO ($n = 6$) mice. The displayed dotplots were obtained by gating live and CD45+ cells. **(B)** Quantification and analysis of myeloid cell populations in the different mouse genotypes. **(C)** Flow cytometry analysis of lymphoid cell populations in 4T1 tumors from the same mice as in A. The displayed dotplots were gated from live and CD45+ cells. **(D)** Quantification and analysis of lymphoid cell populations in the different mouse genotypes. Data represent mean \pm SD * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ (One-way ANOVA test followed by Bonferroni's Multiple Comparison Test).



a major role for NK cells in mammary tumor growth control (Figures 6A,B).

We then asked whether caspase-1 expression within the immune compartment could affect NK cell phenotype and activation. As shown in Figure 6C, NK cells infiltrating the mammary tumors of *Caspase-1* KO were larger (according to FSC parameters) than those infiltrating WT mice, a feature which is commonly associated with a stronger activation status (41). Furthermore, NK cells present in the tumor of *Caspase-1*-deficient hosts expressed higher levels of NK cell activation markers NKG2D, Granzyme B (GZB), CD69 and CD98 (Figure 6D) (42). With the exception of NKG2D, few differences were detected between splenic NK cells from WT and *Caspase-1*-deficient tumor-bearing mice, indicating that the tumor microenvironment directly impacts NK cell phenotype (Figure 6E).

We then investigated the ability of tumor infiltrating NK cells to be activated when re-stimulated *in vitro*. Tumor cell

suspensions from WT or *Caspase-1* KO mice were incubated with a combination of IL-12+IL-18 cytokines, or with crosslinking antibodies against activating receptors (NKP46, Ly49D, NKG2D) or with different tumor cell lines (4T1, and YAC1 cells, a classical NK cell target). Interestingly, NK cells from tumors growing in *Caspase-1* KO mice displayed an increased expression of IFN- γ following activation compared to those from tumors growing in WT mice, irrespective of the stimulus used (Figure 6F and Supplementary Figure 4A). In addition, in the tumor cell suspension from *Caspase-1* KO mice, significantly more NK cells were activated (positive to IFN- γ) in response to YAC-1 or 4T1 stimulation compared with WT (Figure 6G and Supplementary Figure 4B). These results suggest that the absence of caspase-1 from the tumor immune microenvironment promotes NK cell activation.

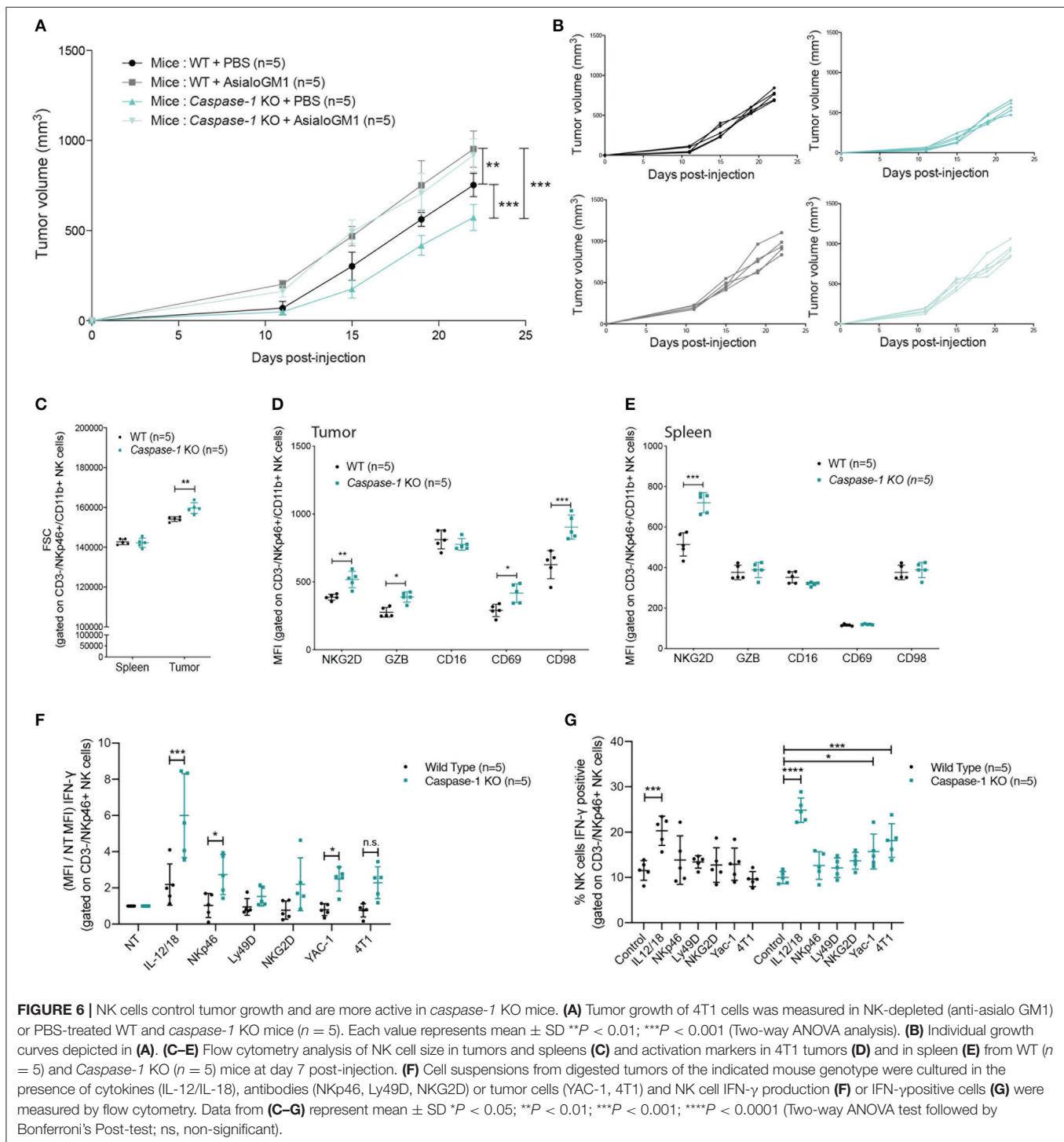
DISCUSSION

The role of inflammasome activation in cancer (15, 43) remains largely undefined and can be either pro-tumoral or anti-tumoral. The data presented here suggest that the inflammasome promotes the growth of invasive breast cancer in two mouse models, the MMTV-Neu and 4T1 cells. Interestingly, bone marrow chimeric mouse experiments demonstrated that caspase-1-expressing immune cells promote mammary tumor progression.

Despite the fact that necrotic cell death occurs during tumor progression releasing DAMPs, such as ATP, or uric acid, tumor growth was independent of NLRP3, suggesting either redundancy or the involvement of another PRR. Other innate immune receptors such as AIM2 or NLRC4 can form inflammasome platforms. AIM2 is a DNA sensor, which can be activated by circulating-free DNA released by dying cells (44, 45). And NLRC4 was recently shown to promote mammary tumor growth in a model of high fat diet-induced obesity via the production of IL-1 β (46). Further experiments would be required using KO animals in the BALB/c background to determine their putative involvement in tumor progression of invasive breast cancer.

NK cells are an important aspect of the anti-tumor arsenal and their presence is associated with good prognosis in several types of cancers (47, 48). However, during cancer progression malignant cells develop different strategies to escape or to dampen NK cell functions (39, 49). Indeed, NK cell activity was shown to be reduced in the blood of primary and metastatic breast cancer patients (50).

With respect to the role of the inflammasome on NK cell function, former studies mostly addressed its involvement in mouse models of cancer metastasis (15). For instance, *Nlrp3*-deficient mice displayed reduced number of melanoma lung metastasis due to more active NK cells in a caspase-1-independent way, while in the context of colon metastasis to the liver, caspase-1 and NLRP3 were protective by promoting more active NK cells in the livers of WT mice compared with *Caspase-1*-deficient mice (17, 37). Here, we showed for the first time that the absence of a functional inflammasome



improved NK cell recruitment and activation in the mammary tumor microenvironment. Higher levels of CCL5 were also detected in the tumor supernatant of *Caspase-1*-deficient tumors consistent with an increase in NK cells recruitment and activation (51, 52). We further showed that NK cells from *Caspase-1*-deficient mice responded better to *ex vivo* re-stimulations, and NK cell depletion in WT and *Caspase-1*-deficient mice resulted

in similar tumor growth rates, demonstrating the major role of NK cells on tumor growth control. Since the phenotype of NK cells was similar in WT and in *Caspase-1* KO mouse spleens, our results suggest that the tumor microenvironment directly modulates NK cell anti-tumor response, as previously described in invasive breast cancer and non-small cell lung cancer (NSCLC) models (53, 54).

Our observations also revealed that Ly6C^{int}-Ly6G^{high} neutrophils were less abundant in the tumor microenvironment of inflammasome-deficient mice. Several studies have described these tumor infiltrating cells as myeloid-derived suppressor cell (MDSC) populations, due to their ability to down-regulate the anti-cancer immune response (55, 56). For instance, MDSC recruited within the tumor bed are able to suppress NK cell cytotoxicity, IFN- γ production and NKG2D expression (57). MDSCs promote primary and metastatic 4T1 tumor progression (26), and impairing their recruitment to the tumor microenvironment limits tumor growth (22, 58). Intriguingly, Chow et al. reported in *Nlrp3* KO lungs the presence of a CD11b⁺ Gr-1^{int} population which, upon adoptive transfer into WT animals, suppressed lung metastasis of melanoma cells (17). Moreover, those cells secreted CCL5. However, we did not observe the recruitment of a similar population in the mammary immune infiltrate of *Caspase-1* or *Asc* KO mice. Thus, our data suggest that the inflammasome supports tumor growth by recruiting Ly6C^{int}-Ly6G^{high} cells to the tumor bed preventing NK cell infiltration and activation.

Activation and secretion of the two pro-inflammatory cytokines IL-1 β and IL-18 are mostly regulated through the inflammasome. According to previous studies, IL-1 β promotes 4T1 tumor growth (26, 27). However, we did not detect any difference in intra-tumoral IL-1 β concentration and the inhibition of the IL-1R pathway by IL-1Ra administration or through the immune-depletion of IL-1 β *in vivo* did not impair 4T1 growth. Moreover, injecting the same anti-IL-1 β used by Kaplanov et al. in WT mice did not affect 4T1 growth, although tumor volumes were globally much smaller in their study compared with ours (32). In addition, Bruchard et al. described no decrease in tumor growth in the presence of IL-1Ra (59). IL-18 inhibition, and the combination of both IL-1 β and IL-18 inhibition also had no impact on tumor cell growth. The discrepancies observed these different studies could be explained by the BALB/c strain that we used or by specific in-house microbiota. Of note, using the aggressive PyMT mouse model of invasive breast carcinoma intercrossed with the *Il-1r* KO background, Dagenais and colleagues observed an increase in tumor burden and aggressiveness, while no effect on the composition of the tumor immune microenvironment was noted, minimizing the role of the IL-1R pathway as a main modulator of breast cancer progression through the modulation of the immune composition (60). Thus, in our model, the inflammasome may support tumor growth through as yet understudied effector mechanisms. They could be pyroptosis, which induces pore formation in the plasma membrane and the release of the intracellular content, or caspase-1 mediated eicosanoid storm (12, 61). Eicosanoids, and especially prostaglandin E2 (PGE2) synthesized by cyclooxygenases, were known to suppress anti-tumor immunity by inhibiting NK cell viability and activation, and to promote cancer growth (51, 62, 63).

Altogether, our study highlights a new role for the inflammasome in promoting invasive breast cancer progression by facilitating tumor infiltration with neutrophils, while impeding the NK cell-associated anti-tumoral response

independently of IL-1 β and IL-18. These results suggest that inflammasome catalytic inhibition could be an interesting therapeutic approach for breast cancer.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by the local Animal Ethic Evaluation Committee (CECCAPP: C2EA-15, Comité d'Evaluation Commun au PBES, à AniCan, au laboratoire P4, à l'animalerie de transit de l'ENS, à l'animalerie de l'IGFL, au PRECI, à l'animalerie du Cours Albert Thomas, au CARRTEL INRA Thonon-les-Bains et à l'animalerie de transit de l'IBCP, CLB-2013-019, CLB-2015-015) and authorized by the French Ministry of Education and Research.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

BG, TW, and VP designed experiments. BG, MB-W, AD, MP, IP, AE, and VP performed research. NG, NB-V, CC, and TW contributed to agents/analytic tools. BG, TW, and VP analyzed data. BG and VP wrote the paper. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This work was supported by the Ligue contre le Cancer comité de l'Ain and the Plan Cancer FP7-PEOPLE-ERG2-2008 n°239479. BG was supported by the Fondation ARC pour la recherche sur le cancer. TW is supported by the Fondation ARC (équipe labellisée).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank V. M. Dixit (Genentech) for the *Asc*^{-/-} mice; the late J. Tschopp (University of Lausanne) for the *Nlrp3*^{-/-} mice; R. A. Flavell (Yale School of Medicine) for the *Caspase-1/caspase-11*^{-/-} mice; Uzma Hasan for providing Anakinra; the Plateforme d'Expérimentation Animale en Cancérologie (AniCan) facility and Julie Gorry for technical help. We thank Brigitte Manship for English editing of the manuscript. The content of this manuscript has been partly published as part of the Ph.D., thesis of BG (64).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2020.01683/full#supplementary-material>

Supplementary Figure 1 | Caspase-1 and ASC deficiency alters the composition of the tumor immune infiltrate in tumors but not that of the spleen. **(A)** Flow cytometry quantification of CD45 positive cells in 4T1 tumors isolated from WT ($n = 6$), *Caspase-1* KO ($n = 6$), and *Asc* KO ($n = 6$) mice 14 days post-injection. **(B)**

Correlation graph of NK cells vs. neutrophils infiltrated in 4T1 tumors isolated from WT ($n = 6$), *Caspase-1* KO ($n = 6$), and *Asc* KO ($n = 6$) mice 14 days post-injection. **(C,D)** Flow cytometry quantification and analysis of myeloid **(C)** and lymphoid **(D)** cell populations from WT, *Caspase-1* KO, and *Asc* KO mice 7 days post-injection with 4T1 mammary tumor cells. **(E,F)** Flow cytometry quantification and analysis of myeloid **(E)** and lymphoid **(F)** cell populations in spleens from WT ($n = 4$), *Caspase-1* KO ($n = 4$), and *Asc* KO ($n = 4$) mice injected with 4T1 mammary tumor cells at day 14 post 4T1 tumor cell injection. Data represent mean \pm SD * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (One-way ANOVA test followed by Bonferroni's Multiple Comparison Test).

Supplementary Figure 2 | IL-1 β inhibition does not affect 4T1 tumor growth *in vivo*. WT mice were injected with IgG control ($n = 7$) or anti-IL1 β antibody ($n = 8$) the day before tumor inoculation and then twice a week. Treated mice were orthotopically injected with 4T1 mammary tumor cells. Tumor growth was measured over 28 days.

Supplementary Figure 3 | Cytokine measurements in tumor cell supernatants of WT or *caspase-1* KO mice by Luminex technology. Supernatants from tumor dilutions of WT ($N = 8$) and *caspase-1* KO ($N = 8$) mice were analyzed by Luminex assay for CCL5 IL-1 β , CCL3, IL-33, KC, and FGF-b. Data represent mean \pm SD (p from unpaired t -test).

Supplementary Figure 4 | NK cells control tumor growth and are more activated in *caspase-1* KO mice. **(A)** Cytometric profiles of data shown in **Figure 6F**. Cell suspensions from digested tumors of the indicated mouse genotype were cultured in the presence of cytokines (IL-12/IL-18), antibodies (NKp46, Ly49D, NKG2D), or tumor cells (YAC-1, 4T1) and NK cell IFN- γ production was measured by flow cytometry. **(B)** Comparison of IFN- γ -positive NK cells from tumor of WT and *Caspase-1* KO mice exposed or not to 4T1 cells.

Supplementary Table 1 | Inventory of fluorochrome conjugated-antibodies used for cytometry analysis.

REFERENCES

- DeNardo DG, Barreto JB, Andreu P, Vasquez L, Tawfik D, Kolhatkar N, et al. CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages. *Cancer Cell*. (2009) 16:91–102. doi: 10.1016/j.ccr.2009.06.018
- Coussens LM, Zitvogel L, Palucka K. Neutralizing tumor-promoting chronic inflammation: a magic bullet? *Science*. (2013) 339:286–91. doi: 10.1126/science.1232227
- Fridman WH, Pagès F, Sautès-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer*. (2012) 12:298–306. doi: 10.1038/nrc3245
- Fridman W-H, Dieu-Nosjean M-C, Pagès F, Cremer I, Damotte D, Sautès-Fridman C, et al. The immune microenvironment of human tumors: general significance and clinical impact. *Cancer Microenviron*. (2013) 6:117–22. doi: 10.1007/s12307-012-0124-9
- Kristensen VN, Vaske CJ, Ursini-Siegel J, Van Loo P, Nordgard SH, Sachidanandam R, et al. Integrated molecular profiles of invasive breast tumors and ductal carcinoma *in situ* (DCIS) reveal differential vascular and interleukin signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2012) 109:2802–7. doi: 10.1073/pnas.1108781108
- Nagalla S, Chou JW, Willingham MC, Ruiz J, Vaughn JP, Dubey P, et al. Interactions between immunity, proliferation and molecular subtype in breast cancer prognosis. *Genome Biol*. (2013) 14:R34. doi: 10.1186/gb-2013-14-4-r34
- Giraldo NA, Becht E, Remark R, Damotte D, Sautès-Fridman C, Fridman WH. The immune contexture of primary and metastatic human tumours. *Curr Opin Immunol*. (2014) 27:8–15. doi: 10.1016/j.coi.2014.01.001
- Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. (2002) 420:860–7. doi: 10.1038/nature01322
- Shalapour S, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer: an eternal fight between good and evil. *J Clin Invest*. (2015) 125:3347–55. doi: 10.1172/JCI80007
- Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell*. (2010) 140:821–32. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.040
- Rathinam VAK, Fitzgerald KA. Inflammasome complexes: emerging mechanisms and effector functions. *Cell*. (2016) 165:792–800. doi: 10.1016/j.cell.2016.03.046
- Kovacs SB, Miao EA. Gasdermins: effectors of pyroptosis. *Trends Cell Biol*. (2017) 27:673–84. doi: 10.1016/j.tcb.2017.05.005
- Allen IC, TeKippe EM, Woodford R-MT, Uronis JM, Holl EK, Rogers AB, et al. The NLRP3 inflammasome functions as a negative regulator of tumorigenesis during colitis-associated cancer. *J Exp Med*. (2010) 207:1045–56. doi: 10.1084/jem.20100050
- Hu B, Elinav E, Huber S, Booth CJ, Strowig T, Jin C, et al. Inflammation-induced tumorigenesis in the colon is regulated by caspase-1 and NLRP3. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2010) 107:21635–40. doi: 10.1073/pnas.1016814108
- Petrilli V. The multifaceted roles of inflammasome proteins in cancer. *Curr Opin Oncol*. (2017) 29:35–40. doi: 10.1097/CCO.0000000000000346
- Nakamura K, Kassem S, Cleynen A, Chrétien M-L, Guillerey C, Putz EM, et al. Dysregulated IL-18 is a key driver of immunosuppression and a possible therapeutic target in the multiple myeloma microenvironment. *Cancer Cell*. (2018) 33:634–48.e5. doi: 10.1016/j.ccell.2018.02.007
- Chow MT, Sceneay J, Paget C, Wong CSE, Duret H, Tschopp J, et al. NLRP3 suppresses NK cell-mediated responses to carcinogen-induced tumors and metastases. *Cancer Res*. (2012) 72:5721–32. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0509
- Chow MT, Tschopp J, Möller A, Smyth MJ. NLRP3 promotes inflammation-induced skin cancer but is dispensable for asbestos-induced mesothelioma. *Immunol Cell Biol*. (2012) 90:983–6. doi: 10.1038/icb.2012.46
- Drexler SK, Bonsignore L, Masin M, Tardivel A, Jackstadt R, Hermeking H, et al. Tissue-specific opposing functions of the inflammasome adaptor ASC in the regulation of epithelial skin carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2012) 109:18384–9. doi: 10.1073/pnas.1209171109
- Miller LJ, Kurtzman SH, Anderson K, Wang Y, Stankus M, Renna M, et al. Interleukin-1 family expression in human breast cancer: interleukin-1 receptor antagonist. *Cancer Invest*. (2000) 18:293–302. doi: 10.3109/07357900009012171
- Pantschenko AG, Pushkar I, Anderson KH, Wang Y, Miller LJ, Kurtzman SH, et al. The interleukin-1 family of cytokines and receptors in human breast cancer: implications for tumor progression. *Int J Oncol*. (2003) 23:269–84. doi: 10.3892/ijo.23.2.269
- Bunt SK, Yang L, Sinha P, Clements VK, Leips J, Ostrand-Rosenberg S. Reduced inflammation in the tumor microenvironment delays the accumulation of myeloid-derived suppressor cells and limits tumor progression. *Cancer Res*. (2007) 67:10019–26. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2354
- Dirat B, Bochet L, Dabek M, Daviaud D, Dauvillier S, Majed B, et al. Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion. *Cancer Res*. (2011) 71:2455–65. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-3323
- Guo B, Fu S, Zhang J, Liu B, Li Z. Targeting inflammasome/IL-1 pathways for cancer immunotherapy. *Sci Rep*. (2016) 6:36107. doi: 10.1038/srep36107
- Calogero RA, Cordero F, Forni G, Cavallo F. Inflammation and breast cancer. Inflammatory component of mammary carcinogenesis in ErbB2 transgenic mice. *Breast Cancer Res*. (2007) 9:211. doi: 10.1186/bcr1745
- Bunt SK, Sinha P, Clements VK, Leips J, Ostrand-Rosenberg S. Inflammation induces myeloid-derived suppressor cells that facilitate tumor progression. *J Immunol*. (2006) 176:284–90. doi: 10.4049/jimmunol.176.1.284
- Elkabetz M, Ribeiro VSG, Dinarello CA, Ostrand-Rosenberg S, Di Santo JP, Apte RN, et al. IL-1 β regulates a novel myeloid-derived suppressor cell subset that impairs NK cell development and function. *Eur J Immunol*. (2010) 40:3347–57. doi: 10.1002/eji.201041037
- Martinon F, Pétrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature*. (2006) 440:237–41. doi: 10.1038/nature04516

29. Mariathasan S, Newton K, Monack DM, Vucic D, French DM, Lee WP, et al. Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature*. (2004) 430:213–8. doi: 10.1038/nature02664
30. Kuida K, Lippke JA, Ku G, Harding MW, Livingston DJ, Su MS, et al. Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme. *Science*. (1995) 267:2000–3. doi: 10.1126/science.7535475
31. Boggio K, Nicoletti G, Di Carlo E, Cavallo F, Landuzzi L, Melani C, et al. Interleukin 12-mediated prevention of spontaneous mammary adenocarcinomas in two lines of Her-2/neu transgenic mice. *J Exp Med*. (1998) 188:589–96. doi: 10.1084/jem.188.3.589
32. Kaplanov I, Carmi Y, Kornetsky R, Shemesh A, Shurin GV, Shurin MR, et al. Blocking IL-1 β reverses the immunosuppression in mouse breast cancer and synergizes with anti-PD-1 for tumor abrogation. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2019) 116:1361–9. doi: 10.1073/pnas.1812266115
33. Shi Y, Evans JE, Rock KL. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature*. (2003) 425:516–21. doi: 10.1038/nature01991
34. Tesniere A, Panaretakis T, Kepp O, Apetoh L, Ghiringhelli F, Zitvogel L, et al. Molecular characteristics of immunogenic cancer cell death. *Cell Death Differ*. (2008) 15:3–12. doi: 10.1038/sj.cdd.4402269
35. Stienstra R, Joosten LAB, Koenen T, van Tits B, van Diepen JA, van den Berg SAA, et al. The inflammasome-mediated caspase-1 activation controls adipocyte differentiation and insulin sensitivity. *Cell Metab*. (2010) 12:593–605. doi: 10.1016/j.cmet.2010.11.011
36. Yazdi AS, Drexler SK, Tschopp J. The role of the inflammasome in nonmyeloid cells. *J Clin Immunol*. (2010) 30:623–7. doi: 10.1007/s10875-010-9437-y
37. Dupaul-Chicoine J, Arabzadeh A, Dagenais M, Douglas T, Champagne C, Morizot A, et al. The Nlrp3 inflammasome suppresses colorectal cancer metastatic growth in the liver by promoting natural killer cell tumoricidal activity. *Immunity*. (2015) 43:751–63. doi: 10.1016/j.immuni.2015.08.013
38. Terme M, Ullrich E, Aymeric L, Meinhardt K, Desbois M, Delahaye N, et al. IL-18 induces PD-1-dependent immunosuppression in cancer. *Cancer Res*. (2011) 71:5393–9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-0993
39. Roberti MP, Mordoh J, Levy EM. Biological role of NK cells and immunotherapeutic approaches in breast cancer. *Front Immunol*. (2012) 3:375. doi: 10.3389/fimmu.2012.00375
40. Chiossone L, Dumas PY, Vienne M, Vivier E. Natural killer cells and other innate lymphoid cells in cancer. *Nat Rev Immunol*. (2018) 18:671–88. doi: 10.1038/s41577-018-0061-z
41. Marçais A, Cherfils-Vicini J, Viant C, Degouve S, Viel S, Fenis A, et al. The metabolic checkpoint kinase mTOR is essential for IL-15 signaling during the development and activation of NK cells. *Nat Immunol*. (2014) 15:749–57. doi: 10.1038/ni.2936
42. Cichocki F, Miller JS, Anderson SK, Bryceson YT. Epigenetic regulation of NK cell differentiation and effector functions. *Front Immunol*. (2013) 4:55. doi: 10.3389/fimmu.2013.00055
43. Mangan MSJ, Olhava EJ, Roush WR, Seidel HM, Glick GD, Latz E. Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases. *Nat Rev Drug Discov*. (2018) 17:588–606. doi: 10.1038/nrd.2018.97
44. Jakobs C, Perner S, Hornung V. AIM2 drives joint inflammation in a self-DNA triggered model of chronic polyarthritis. *PLoS ONE*. (2015) 10:e0131702. doi: 10.1371/journal.pone.0131702
45. Schattgen SA, Gao G, Kurt-Jones EA, Fitzgerald KA. Cutting edge: DNA in the lung microenvironment during influenza virus infection tempers inflammation by engaging the DNA sensor AIM2. *J Immunol*. (2016) 196:29–33. doi: 10.4049/jimmunol.1501048
46. Kolb R, Phan L, Borchering N, Liu Y, Yuan F, Janowski AM, et al. Obesity-associated NLRC4 inflammasome activation drives breast cancer progression. *Nat Commun*. (2016) 7:13007. doi: 10.1038/ncomms13007
47. Coca S, Perez-Piqueras J, Martinez D, Colmenarejo A, Saez MA, Vallejo C, et al. The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma. *Cancer*. (1997) 79:2320–8. doi: 10.1002/(SICI)1097-0142(19970615)79:12<2320::AID-CNCR5>3.0.CO;2-P
48. Villegas FR, Coca S, Villarrubia VG, Jiménez R, Chillón MJ, Jareño J, et al. Prognostic significance of tumor infiltrating natural killer cells subset CD57 in patients with squamous cell lung cancer. *Lung Cancer*. (2002) 35:23–8. doi: 10.1016/S0169-5002(01)00292-6
49. Mamesier E, Sylvain A, Thibault ML, Houvenaeghel G, Jacquemier J, Castellano R, et al. Human breast cancer cells enhance self tolerance by promoting evasion from NK cell antitumor immunity. *J Clin Invest*. (2011) 121:3609–22. doi: 10.1172/JCI45816
50. Verronèse E, Delgado A, Valladeau-Guilemond J, Garin G, Guillemaut S, Tredan O, et al. Immune cell dysfunctions in breast cancer patients detected through whole blood multi-parametric flow cytometry assay. *Oncoimmunology*. (2016) 5:e1100791. doi: 10.1080/2162402X.2015.1100791
51. Böttcher JP, Bonavita E, Chakravarty P, Bles H, Cabeza-Cabrero M, Sammicheli S, et al. NK cells stimulate recruitment of cDC1 into the tumor microenvironment promoting cancer immune control. *Cell*. (2018) 172:1022–37.e14. doi: 10.1016/j.cell.2018.01.004
52. Bezman NA, Kim CC, Sun JC, Min-Oo G, Hendricks DW, Kamimura Y, et al. Molecular definition of the identity and activation of natural killer cells. *Nat Immunol*. (2012) 13:1000–9. doi: 10.1038/ni.2395
53. Mamesier E, Sylvain A, Bertucci F, Castellano R, Finetti P, Houvenaeghel G, et al. Human breast tumor cells induce self-tolerance mechanisms to avoid NKG2D-mediated and DNAM-mediated NK cell recognition. *Cancer Res*. (2011) 71:6621–32. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-0792
54. Cremer I, Fridman WH, Sautès-Fridman C. Tumor microenvironment in NSCLC suppresses NK cells function. *Oncoimmunology*. (2012) 1:244–6. doi: 10.4161/onci.1.2.18309
55. Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol*. (2012) 12:253–68. doi: 10.1038/nri3175
56. Keskinov AA, Shurin MR. Myeloid regulatory cells in tumor spreading and metastasis. *Immunobiology*. (2015) 220:236–42. doi: 10.1016/j.imbio.2014.07.017
57. Li H, Han Y, Guo Q, Zhang M, Cao X. Cancer-expanded myeloid-derived suppressor cells induce anergy of NK cells through membrane-bound TGF- β 1. *J Immunol*. (2009) 182:240–9. doi: 10.4049/jimmunol.182.1.240
58. Sinha P, Clements VK, Fulton AM, Ostrand-Rosenberg S. Prostaglandin E2 promotes tumor progression by inducing myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res*. (2007) 67:4507–13. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-4174
59. Bruchard M, Mignot G, Derangère V, Chalmin F, Chevriaux A, Végran F, et al. Chemotherapy-triggered cathepsin B release in myeloid-derived suppressor cells activates the Nlrp3 inflammasome and promotes tumor growth. *Nat Med*. (2012) 19:57–64. doi: 10.1038/nm.2999
60. Dagenais M, Dupaul-Chicoine J, Douglas T, Champagne C, Morizot A, Saleh M. The Interleukin (IL)-1R1 pathway is a critical negative regulator of PyMT-mediated mammary tumorigenesis and pulmonary metastasis. *Oncoimmunology*. (2017) 6:e1287247. doi: 10.1080/2162402X.2017.1287247
61. von Moltke J, Trinidad NJ, Moayeri M, Kintzer AF, Wang SB, van Rooijen N, et al. Rapid induction of inflammatory lipid mediators by the inflammasome *in vivo*. *Nature*. (2012) 490:107–11. doi: 10.1038/nature11351
62. Howe LR, Chang SH, Tolle KC, Dillon R, Young LJT, Cardiff RD, et al. HER2/neu-induced mammary tumorigenesis and angiogenesis are reduced in cyclooxygenase-2 knockout mice. *Cancer Res*. (2005) 65:10113–10119. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1524
63. Zelenay S, van der Veen AG, Böttcher JP, Snelgrove KJ, Rogers N, Acton SE, et al. Cyclooxygenase-dependent tumor growth through evasion of immunity. *Cell*. 162:1257–70. (2015). doi: 10.1016/j.cell.2015.08.015
64. Guey B. *Inflammasomes: Des Mécanismes D'activation de la Caspase-1 à la Progression Tumorale*. Lyon: Université de Lyon (2016).

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Guey, Bodnar-Wachtel, Drouillard, Eberhardt, Pratiel, Goutagny, Bendriss-Vermare, Puisieux, Caux, Walzer and Petrilli. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Résumé

L'Interleukine-33 est une cytokine appartenant à la famille des IL-1s. Elle est exprimée de manière constitutive dans le noyau de certaines cellules non-hématopoïétiques (cellules endothéliales, épithéliales dans les tissus barrières ou stromales non-immunitaires). En réponse à un danger ou un ensemble de stress cellulaires, elle est rapidement libérée dans le milieu extracellulaire pour agir comme une alarmine pléiotrope. En effet, l'IL-33 régule les réponses immunitaires de type-2 (anti-parasitaires, allergiques, pro-tumorales) mais également de type-1 (anti-virales, anti-tumorales). Ainsi, son rôle dans les cancers est controversé. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés au rôle de l'IL-33 dans l'activation des cellules NK et leurs propriétés anti-tumorales. Nos travaux démontrent que, l'IL-33, lorsqu'elle est combinée avec l'IL-12, est un activateur puissant des fonctions sécrétrices et cytotoxiques des cellules NK chez l'homme et la souris, en contexte physiologique et tumoral. Dans cette synergie, l'IL-12 est nécessaire pour activer la voie STAT-4 qui régule directement l'expression de ST2, récepteur de l'IL-33, à la surface d'une sous-population de cellules NK chez l'homme. La caractérisation phénotypique, fonctionnelle et transcriptionnelle des cellules NK ST2⁺ identifie une sous-population polyfonctionnelle et intermédiaire au sein des cellules NK CD56^{dim} qui maintient la capacité de produire de grandes quantités de cytokines de par leur programme transcriptionnel commun avec les cellules NK CD56^{bright}. En contexte tumoral, chez la souris mais également chez l'homme, nous avons observé que les cellules NK maintiennent la capacité de répondre à une activation par l'IL-33 combinée à l'IL-12 en produisant de l'IFN- γ . Cette production d'IFN- γ est associée à une diminution de la croissance tumorale dans un modèle murin de cancer du sein. Dans l'ensemble, ces résultats identifient l'IL-33 comme un activateur puissant d'une sous-population distincte de cellules NK polyfonctionnelles à fort potentiel thérapeutique dans le cancer.

Mots clés

Interleukine-33, Cellules NK, Cancer du sein, IFN- γ , ST2