

Université de Montréal

Caractérisation phénotypique et fonctionnelle des cellules NK en contexte physiologique et
néoplasique

Par

Maher Al Khaldi, MD

Programme de sciences biomédicales

Faculté de médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Maîtrise (MSc)

en Sciences biomédicales, option médecine expérimentale

Avril, 2021

© Maher Al Khaldi, 2021

Université de Montréal

Faculté de médecine

Ce mémoire intitulé

Caractérisation phénotypique et fonctionnelle des cellules NK en contexte physiologique et
néoplasique

Présenté par

Maher Al Khaldi, MD

A été évalué(e) par un jury composé des personnes suivantes

Walid Mourad, PhD

Président-rapporteur

Lee-Hwa Tai, PhD

Membre du jury

Lucas Sideris, MD, FRCSC

Co-directeur de recherche

Sylvie Lesage, PhD

Directrice de recherche

Résumé

La cellule NK fait partie du système immunitaire inné et participe à l'immunosurveillance anti-tumorale. La compréhension des facteurs affectant leur biologie, telle que la génétique, est donc cruciale. Dans un premier temps, nous avons évalué le rôle de la sous-unité d'intégrine CD11d, sur le phénotype et l'expression d'autres sous-unités (CD11a, CD11b, CD11c, CD18) de diverses cellules immunitaires entre un modèle murin CD11d-KO et une souris C57BL/6 (B6). Nous avons remarqué que l'effet de la délétion de CD11d sur l'expression des autres sous-unités d'intégrine est spécifique à chaque type de cellule immunitaire. La différence la plus notable dans l'expression de CD11b et CD11c a été observée dans les cellules NK. La perte de CD11d dans les cellules NK a entraîné une diminution de l'expression de CD107a après leur activation, ce qui suggère une altération de la dégranulation des cellules NK. Ensuite, malgré une croissance de mélanome similaire, une plus grande proportion de cellules NK issues de CD11d-KO se sont accumulées dans les lits tumoraux par rapport à leur homologue B6.

Dans un deuxième temps, nous avons exploité le modèle murin NOD, connu d'avoir des défauts immunitaires importants. L'acquisition des fonctions cytotoxiques des cellules NK se fait par un processus appelé maturation fonctionnelle où une cellule NK est d'abord CD27⁻CD11b⁻, suivi du stade CD27⁺CD11b⁻, puis CD27⁺CD11b⁺ et finalement CD27⁻CD11b⁺, soit le stade le plus mature et cytotoxique. Nous avons démontré que les cellules NK de la souris NOD produisent nettement moins d'IFN- γ , de TNF α et de Granzyme B et échouent à réguler l'expression du récepteur d'activation NKG2D pour chaque stade de maturation fonctionnelle. Finalement, nous avons traité des souris immunodéficientes porteuses de tumeurs avec des cellules NK de NOD et B6. Nous avons démontré que, tout comme pour les cellules NK de B6, ce sont surtout des cellules NK CD27⁺ de NOD qui s'accumulent dans les tumeurs. Par contre, les souris injectées avec des cellules de NOD montraient une croissance tumorale significativement plus importante.

De manière générale, ces études sont les premières à élucider les impacts de l'absence de CD11d sur le phénotype et la fonction des cellules NK ainsi que leurs défauts fonctionnels dans la souris NOD au cours de leur maturation fonctionnelle.

Mots-clés : cellule *Natural Killer*, NK, intégrine, CD11d, souris *Non-Obese Diabetic*, maturation fonctionnelle

Abstract

NK cells are part of the innate immune system and participate in anti-tumor immunosurveillance. Understanding the factors affecting their biology, such as genetics, is therefore crucial. First, we evaluated the role of the integrin subunit CD11d on the phenotype and expression of other subunits (CD11a, CD11b, CD11c, CD18) of various immune cells between a CD11d-KO mouse model and a C57BL/6 (B6) mouse. We noted that the effect of CD11d deletion on the expression of other integrin subunits is specific to each immune cell type. The most notable difference in CD11b and CD11c expression was observed in NK cells. Loss of CD11d in NK cells resulted in decreased CD107a expression after their activation, suggesting impaired NK cell degranulation. Second, despite similar melanoma growth, a greater proportion of CD11d-KO-derived NK cells accumulated in tumor beds compared to their B6 counterpart.

We then exploited the NOD mouse model, known to have significant immune defects. The acquisition of cytotoxic functions of NK cells occurs through a process called functional maturation where an NK cell is first CD27⁻CD11b⁻, followed by the CD27⁺CD11b⁻ stage, then CD27⁺CD11b⁺ and finally CD27⁻CD11b⁺, the most mature and cytotoxic stage. We demonstrated that NK cells from NOD mice produce significantly less IFN- γ , TNF α , and Granzyme B and fail to regulate the expression of the activation receptor NKG2D for each stage of functional maturation. Finally, we treated immunodeficient tumor-bearing mice with NOD and B6 NK cells. We demonstrated that, as with B6 NK cells, NOD CD27⁺ NK cells predominantly accumulated in tumors. However, mice injected with NOD NK cells showed significantly greater tumor growth.

Overall, these studies are the first to elucidate the impact of the absence of CD11d on the phenotype and function of NK cells as well as their functional defects in NOD mice during their functional maturation.

Keywords: Natural Killer cell, NK, integrin, CD11d, *Non-Obese Diabetic* mouse, functional maturation

Table des matières

1.	CHAPITRE 1 – INTRODUCTION	1
1.1.	Système immunitaire	1
1.1.1.	Système immunitaire inné	2
1.1.1.1.	Composantes du système immunitaire inné.....	2
1.1.1.2.	Reconnaissance pathogénique	3
1.2.	Cellules NK	5
1.2.1.	Développement et maturation fonctionnelle des cellules NK murines	5
1.2.2.	Développement et maturation fonctionnelle des cellules NK humaines.....	9
1.2.3.	Cellules pré-mNK murines.....	11
1.2.4.	Rôle des facteurs de transcription dans le développement des cellules NK.....	13
1.2.5.	Rôle des cytokines dans le développement des cellules NK	13
1.2.6.	Éducation des cellules NK	15
1.2.7.	Récepteurs des cellules NK	15
1.2.8.	Fonctions des cellules NK.....	18
1.2.8.1.	Mécanismes de cytotoxicité.....	18
1.2.8.2.	Sécrétion de cytokines	20
1.2.9.	Cellules NK en contexte tumoral.....	22
1.2.10.	Cellules NK : système immunitaire inné, adaptatif ou les deux?	29
1.3.	Intégrines	30
1.3.1.	Intégrines $\beta 2$	31
1.3.1.1.	Cellules pré-mNKs, sous-unité CD11d et intégrine CD11d/CD18.....	35
1.4.	Modèles murins en recherche	37

1.4.1.	Lignée C57BL/6	37
1.4.2.	Lignée CD11d-KO	38
1.4.3.	Lignée NOD	39
1.4.3.1.	Cellules NK dans la lignée NOD	39
1.4.4.	Lignées Rag ^{-/-} .IL2rgc ^{-/-} et NRG.....	41
1.5.	Hypothèses et objectifs de recherche	42
2.	CHAPITRE 2 – LOSS OF CD11D CAUSES A DECREASE IN CD11B AND CD11C EXPRESSION WITH FUNCTIONAL CONSEQUENCES ON NK CELL ACCUMULATION IN TUMOURS	43
2.1.	Title Page.....	44
2.2.	Abbreviations	45
2.3.	Abstract.....	46
2.4.	Introduction	47
2.5.	Methods.....	49
2.5.1.	Mice	49
2.5.2.	Cell preparation and flow cytometry	49
2.5.3.	Antibodies (Abs).....	49
2.5.4.	In vitro NK cell activation using PMA and ionomycin.....	50
2.5.5.	Surface and intracellular staining of NK cell cytotoxic effectors.....	50
2.5.6.	Total RNA extraction	51
2.5.7.	qPCR.....	51
2.5.8.	Tumour cell line maintenance and injection, tumour measurement and preparation	52
2.5.9.	Statistical analyses	52
2.6.	Results.....	53

2.6.1.	Characterization of the CD11d-KO model in the spleen	53
2.6.2.	CD11d deletion alters integrin subunit expression in immune cells and most noticeably in NK cells	53
2.6.3.	CD11d-KO NK cells have decreased CD107a expression.....	55
2.6.4.	B16-infiltrating NK cells from the CD11d-KO mice are present at higher proportions than in WT mice	55
2.7.	Discussion	56
2.8.	Authorship	60
2.9.	Acknowledgments.....	60
2.10.	Conflict of Interest/Disclosure	60
2.11.	References	61
2.12.	Figures.....	65
	66
3.	CHAPITRE 3 – THE NK CELLS OF NOD MICE EXHIBIT FUNCTIONAL DEFECT THROUGHOUT THEIR MATURATION PROCESS.....	77
3.1.	Title Page.....	78
3.2.	Abbreviations	79
3.3.	Abstract.....	80
3.4.	Introduction	81
3.5.	Methods.....	83
3.5.1.	Murine lineages	83
3.5.2.	Cell preparation and flow cytometry	83
3.5.3.	Antibodies (Abs).....	83
3.5.4.	Positive selection of NK cells by magnetic beads.....	84
3.5.5.	Cell sorting of CD27 ⁺ and CD27 ⁻ NK cells.....	84

3.5.6.	In vitro NK cell activation using PMA and ionomycin.....	85
3.5.7.	In vivo stimulation with polyinosinic-polycytidylic acid (Poly I:C).....	85
3.5.8.	Surface and intracellular staining of NK cell cytotoxic effectors.....	85
3.5.9.	Tumour cell line maintenance and injection, tumour measurement and preparation	86
3.5.10.	Statistical analysis	86
3.6.	Results.....	87
3.6.1.	NOD NK cells fail to acquire effector functions throughout their functional maturation	87
3.6.2.	NOD NK cells fail to upregulate NKG2D expression throughout functional maturation	88
3.6.3.	NOD CD27 ⁺ NK cells accumulate in B6F10 tumours.....	90
3.6.4.	Transferred NOD NK cells fail to adequately control tumour growth as opposed to their B6 counterparts despite being phenotypically similar to them	91
3.7.	Discussion	93
3.8.	Authorship	96
3.9.	Acknowledgments.....	96
3.10.	Conflict of Interest/Disclosure	96
3.11.	References	97
3.12.	Figures.....	101
4.	CHAPITRE 4 – DISCUSSION.....	111
4.1.	Retour sur le rôle de CD11d dans la biologie des cellules NK et perspectives futures.....	113
4.2.	Retour sur les cellules NK de NOD et perspectives futures	119
4.3.	Conclusion.....	123

Liste des tableaux

Tableau 1. – Distribution et fonctions des principales intégrines leucocytaires	34
--	----

Liste des figures

Figure 1. Proportions des sous-populations des cellules NK matures murines.....	7
Figure 2. Stades de développement des NKPs, des cellules iNK et des mNK.	8
Figure 3. Représentation schématique du développement de cellules NK humaines dans la moelle osseuse et les ganglions lymphatiques.	10
Figure 4. Positionnement des cellules pré-mNK dans la voie de différenciation des cellules NK.	12
Figure 5. Le rôle des récepteurs composés de la sous-unité γ_c dans le développement des cellules NK.....	14
Figure 6. L'équilibre des signaux inhibiteurs et stimulants qu'une cellule NK reçoit détermine le type d'interaction avec sa cellule cible.	17
Figure 7. Fonctions des cellules NK.....	21
Figure 8. Mécanismes d'évasion des cellules cancéreuses des cellules NK.....	27
Figure 9. Approches thérapeutiques pour restaurer le potentiel anti-tumoral des cellules NK. .	28
Figure 10. La superfamille des intégrines.	31
Figure 11. Représentation schématique de l'activation et de la signalisation de l'intégrine.	33
Figure 12. Localisation du gène Itgad par rapport aux gènes Itgam, Itgax et Itgal.	114

Liste des sigles et abréviations

ADCC: *antibody-dependent cellular cytotoxicity*

BiKEs: *bi-specific killer engagers*

BLIMP1: *B lymphocyte-induced maturation protein 1*

B6: C57BL/6

CARs: *chimeric antigen receptors*

cDCs: *conventional dendritic cells*

cGAMP: *cyclic guanosine monophosphate–adenosine monophosphate*

CHS: *contact hypersensitivity*

CLP: *common lymphoid progenitor*

CLRs: C-type lectin receptors

CMH: complexe majeur d'histocompatibilité

COMT: centre cellulaire organisateur des microtubules

cNKs: *conventional NK cells*

CR3: *complement receptor-3*

DAP10: *DNAX-activating Protein 10*

DMAPs: *danger-associated molecular patterns*

DN: double-négatives

DP: double-positives

DCs: *dendritic cells*

ECM: *extracellular matrix*

Eomes: *Eomesodermin*

EVs: *extracellular vesicles*

E4BP4: *E4-binding protein 4*

Fab: *fragment antigen-binding*

FASL: FAS ligand

Fc: *fragment crystallizable region*

FDA: Food and Drug Administration

FLIP: FLICE-inhibitory protein
FOXO1: *Forkhead box protein O1*
GATA-3: *GATA-binding protein 3*
G-CSF: *granulocyte colony-stimulating factor*
GITR: *glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor*
GM-CSF: *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*
GvHD: *graft-versus-host disease*
HER2: *human epidermal growth factor 2*
HMGB1: *high-mobility group box 1*
HSCs: *hematopoietic stem cells*
ICAM-1: *intercellular adhesion molecule-1*
iC3b: *inactivated-C3b*
Id: *inhibitor of DNA binding*
IgG: immunoglobulines G
IKDC: *interferon-producing killer dendritic cell*
IKZF3: Ikaros family zinc finger protein 3
IL: interleukine
ILCs: *innate lymphoid cells*
iNK: *immature NK*
IRFs: *interferon regulatory factors*
ITAM: *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*
ITIM: *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*
Itgad: Intégrine alpha D
Itgai: Intégrine alpha L
Itgam: Intégrine alpha M
Itgax: Intégrine alpha X
Itgb2: Intégrine bêta 2
JAK/STAT: *Janus kinases/Signal transducers and activators of transcription*
KIRs: *killer immunoglobulin-like receptors*

KLF4: *Kruppel-like factor 2*
KLRG1: *killer cell lectin-like receptor G1*
LAD: *leukocyte adhesion deficiency syndrome 1*
LAKs: *lymphokine-activated killers*
LAMP-1: *lysosomal-associated membrane protein-1*
LB: lymphocyte B
LFA-1: *lymphocyte function-associated antigen-1*
LMA: leucémie myéloïde aiguë
LMC: leucémie myéloïde chronique
LMPP: *lymphoid-primed multipotent progenitor*
LPS: *lipopolysaccharide*
LT: lymphocyte T
LTi: *lymphoid tissue-inducer cells*
mAbs: *monoclonal antibodies*
Mac-1: antigène macrophage-1
MCMV: *murine cytomegalovirus*
MEF: *myeloid elf-1-like factor*
MICA1: MHC class I polypeptide–related sequence A
mNK: *mature NK*
MTOC: *microtubule organizing center*
NeoR: *neomycin resistance*
NCAM: *neural cell adhesion molecule*
NCRs: *natural cytotoxicity receptors*
NFIL: *Nuclear factor interleukin-3-regulated*
NKC: *natural killer gene complex*
NKG2A: *Natural Killer Group 2A*
NLRs: NOD-like receptors
NOD: *nonobese diabetic*
NF-κB: *nuclear factor κB*

NKP: *NK progenitor*

PAMPs: *pathogen-associated molecular patterns*

pDCs: *plasmacytoid dendritic cells*

PD-1: *Programmed Death-1*

PGF: *placental growth factor*

pre-mNK: *pre-mature NK*

PRRs: *pattern-recognition receptors*

RAG: *recombination-activating gene*

RE: *recycling endosome*

RLRs: *RIG-1-like receptors*

ShRNA: *short hairpin RNA*

SI: *synapse immunologique*

SIDA: *syndrome de l'immunodéficience acquise*

STING: *stimulator of interferon genes*

TAP : *transporter associated with antigen processing*

TCF1: *Transcription factor T cell factor*

TCRs: *T-cell receptors*

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

TLN: *telencephalin*

TNF: *tumour necrosis factor*

TNFR: *tumour necrosis factor receptor*

TFs: *transcription factors*

TRAIL: *TNF-related apoptosis-inducing ligand*

TriKEs: *tri-specific killer engagers*

trNKs: *tissue-resident NK cells*

uNKs: *uterine NK cells*

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

VEGF: *vascular endothelial growth factor*

VIH-1: *virus de l'immunodéficience humaine 1*

γ c: *common gamma chain*

5-FU : 5-fluorouracile

*À ma mère dont les paroles
« lentement, mais sûrement »
ne cessent de résonner dans ma tête*

Remerciements

Un énorme MERCI à :

- Ma directrice de recherche, Dre Sylvie Lesage, pour m'avoir accepté dans son laboratoire malgré mes faibles connaissances en sciences fondamentales au début de ma maîtrise. Merci d'avoir toujours été là. Merci de répondre à mes courriels à la vitesse de la lumière. Tu as été un mentor exceptionnel. Ta rigueur scientifique est inégalée. Tu es la vraie définition de chercheuse!
- Mon co-directeur de recherche, Dr Lucas Sideris, pour m'avoir connecté à Dre Lesage et fait confiance à mes capacités de mener ma maîtrise à terme. Ses conseils en or, son ouverture d'esprit et son expérience m'ont grandement aidé à clarifier mon parcours et mes aspirations futures!
- Mon directeur de programme, Dr Pierre Dubé, pour avoir accepté sans hésitation d'interrompre ma résidence pendant deux années complètes pour dédier mon temps à la recherche à temps plein.
- Geneviève Chabot-Roy, la meilleure assistante de recherche au monde! P.S. tu as un excellent goût en musique.
- Marion Dubuissez pour son support technique, ses conseils, ses réponses à mes questions incessantes et la belle amitié qu'on a développé!
- Lise Coderre pour sa révision critique des manuscrits et sa sagesse.
- Martine Dupuis pour les tris cellulaires et l'assistance technique à la plateforme de cytométrie.
- Catherine Auger-Labelle d'avoir pris soins des souris.
- Tous les autres membres du laboratoire/CRHMR (Aïnhua, Anne-Marie, Sarah, Terrie, Antoine, Félix, Cindy, Adrien et Ernesto et bien sûr Marilaine et Marie-Ève du laboratoire de Dre Heather Melichar,) pour vos réponses à mes questions qui m'ont permis d'avancer dans les projets.
- Ma famille et mes amis qui m'ont toujours supporté depuis le début de la maîtrise.

L'avant-propos

Ayant un intérêt pour la recherche depuis un jeune âge, j'ai toujours voulu effectuer une maîtrise. Au courant de ma résidence en chirurgie générale, je me suis inscrit au programme de cliniciens-chercheurs pour consacrer deux ans de mon parcours postdoctoral en recherche. J'ai découvert le sujet de ma maîtrise un peu par hasard. En effet, c'est en manifestant mon intérêt pour l'oncologie que mon directeur de programme de chirurgie générale, Dr Pierre Dubé, et mon directeur de programme des fondements chirurgicaux, Dr Lucas Sideris, m'ont organisé un rendez-vous avec ma directrice de recherche, Dre Sylvie Lesage. C'est à ce moment-là qu'elle m'avait gentiment proposé de travailler sur les fameuses cellules NK, très pertinentes en oncologie. À l'ère des immunothérapies personnalisées, j'étais excité à l'idée de travailler en laboratoire avec cette population immunitaire. N'ayant aucune expérience en recherche fondamentale, j'avais accepté de m'aventurer dans le monde de l'immuno-oncologie pure et dure et d'acquérir de nouvelles connaissances en dehors de ma zone de confort. Aujourd'hui, je peux définitivement dire que je suis fier de mon accomplissement. La courbe d'apprentissage était exponentielle. J'ai appris à réfléchir différemment, à assimiler l'inconfortable et à accepter l'inconnu. Je suis certain que les connaissances acquises et les expériences apprises me serviront pour le reste de ma vie en tant que chirurgien et chercheur. Finalement, j'aimerais clore cet avant-propos par deux citations quelque peu contrastées. La première est de Bob Sutton qui a dit: « an attitude of wisdom is when you are acting on the best information you have while constantly doubting what you know. A good scientist probably does that ». La deuxième vient de ma directrice de recherche et qui, face à la première citation, m'avait une fois répondu: « au contraire, en médecine - il faut croire et avoir confiance en nos décisions. J'imagine mal avoir confiance en un médecin qui doute de chacune de ses idées et décisions ». Le contraste entre ces deux citations reflète bien l'état d'esprit dans lequel j'étais durant ma maîtrise. De jour, au laboratoire, j'ai dû apprendre à ralentir mon rythme, à me poser des questions auxquelles je n'avais pas les réponses et à laisser la science m'emmener dans des directions inattendues. De nuit, j'étais résident en chirurgie, confiant et déterminé.

1. CHAPITRE 1 – INTRODUCTION

1.1. Système immunitaire

L'**immunité** est définie comme la résistance aux maladies, en particulier les maladies infectieuses. L'ensemble des cellules, tissus et molécules qui participent à la résistance aux insultes biologiques telles les infections forment le **système immunitaire**. La réaction coordonnée de ces cellules et molécules aux pathogènes est connue comme la **réponse immunitaire**.

L'applicabilité de l'immunologie va au-delà des maladies infectieuses. À titre d'exemple, la réponse immunitaire est le principal obstacle à une transplantation d'organe [2]. De plus, le système immunitaire est intrinsèquement lié à l'oncogenèse et au contrôle tumoral. Le domaine de l'immuno-oncologie est en pleine croissance et des immunothérapies contre différents cancers émergent avec des potentiels anti-tumoraux prometteurs [3]. Enfin, des réponses immunitaires défectueuses sont à l'origine de nombreuses maladies auto-immunes et des réactions allergiques [4].

Les mécanismes de défense de l'hôte consistent en une **immunité innée**, qui assure la protection initiale contre des pathogènes, et en une **immunité adaptative** qui se développe plus tardivement et qui est plus spécifique et efficace [4]. L'immunité innée, également appelée immunité native ou naturelle, fait référence aux réponses immunitaires présentes dès la naissance et non « apprises » ou adaptées à la suite d'une exposition à des micro-organismes. À l'inverse, l'immunité adaptative, également appelée immunité acquise ou spécifique, est caractérisée par deux types de lymphocytes, soit les B et T (LB et LT). Ces cellules rencontrent des antigènes de pathogènes ayant échappé au système immunitaire inné dans des organes lymphoïdes et subissent un processus de division et de maturation cellulaire avant d'exercer leur fonction effectrice [4]. Bien que l'immunité fût historiquement dichotomisée en immunités innée et adaptative, il existe en réalité un chevauchement entre ces deux systèmes [5].

1.1.1. Système immunitaire inné

1.1.1.1. Composantes du système immunitaire inné

Le système immunitaire inné est constitué de plusieurs éléments. D'abord, il y a les **barrières physiques** qui comptent les jonctions serrées dans la peau, les surfaces des muqueuses et des membranes épithéliales, le mucus comme dans l'arbre respiratoire et les cellules endothéliales vasculaires qui empêchent la pénétration de pathogènes dans le tractus digestif [6]. Ensuite, le **microbiome humain**, composé de bactéries, de champignons et de virus qui vivent dans et sur le corps humain, est intimement lié au système immunitaire inné. La composition microbienne du corps affecte directement le développement du système immunitaire ainsi que l'efficacité de la réponse immunitaire, protège contre la prolifération de pathogènes néfastes et module l'équilibre entre l'inflammation et l'homéostasie immunitaire [7]. À titre d'exemple, les souris exempts de germes (*germ-free mice*) présentent des déficits importants dans le développement du tissu lymphoïde du tube digestif et sont donc très susceptibles aux infections [8].

Les **composantes cellulaires** de l'immunité innée incluent des cellules myéloïdes qui comprennent les phagocytes mononucléés et les phagocytes polymorphonucléaires. Les phagocytes mononucléés incluent les macrophages, dérivés des monocytes sanguins, qui ont la capacité d'ingérer des pathogènes. Le matériel phagocyté forme un phagosome qui fusionne avec des lysosomes, formant un phagolysosome qui mène à la dégradation des produits ingérés. Également des phagocytes mononucléaires, les cellules dendritiques (*dendritic cells*, DCs), étroitement apparentées et également provenant des monocytes, sont efficaces à présenter des antigènes aux LT du système immunitaire adaptatif. Les phagocytes polymorphonucléaires incluent les neutrophiles, les éosinophiles et les basophiles. Les neutrophiles sont les phagocytes les plus abondants chez l'humain et sont les premières cellules recrutées aux sites d'infection et d'inflammation. Les éosinophiles protègent l'hôte surtout contre des infections parasitaires. Les basophiles, quant à elles, participent à la réponse allergique et à la résistance à l'infestation par les helminthes. S'ajoutent à cet arsenal les mastocytes qui ont des fonctions immunomodulatrices, antimicrobiennes et antiprotozoaires [9]. D'autres cellules, dites « non

professionnelles », telles que les cellules épithéliales, les cellules endothéliales et les fibroblastes contribuent également à l'immunité innée [10].

Les cellules lymphoïdes innées (*innate lymphoid cells*, ILCs) sont un groupe diversifié de lymphocytes présents dans de nombreux tissus, en particulier la peau et les muqueuses pulmonaires et du tractus gastro-intestinal. Contrairement aux LB et LT, elles n'expriment pas de récepteurs spécifiques aux antigènes [11]. Les ILCs peuvent être classés en cinq groupes majeurs sur la base de leur production de cytokines et des facteurs de transcription développementaux : les cellules NK, les ILC1, les ILC2, les ILC3 et les inducteurs de tissu lymphoïde (*lymphoid tissue-inducer cells*, LTi) [12]. Cette classification varie dans la littérature. En effet, les cellules NK sont considérées comme une catégorie à part pour certains, alors que d'autres les classifient parmi les ILC1 [7]. L'objet de ce mémoire porte sur les cellules NK spécifiquement. Le développement, l'activation ainsi que les fonctions des cellules NK seront élaborées plus en détail au cours des prochaines sections.

1.1.1.2. Reconnaissance pathogénique

Les composantes du système inné ne possèdent pas de spécificité antigénique pour la reconnaissance des micro-organismes. En effet, plusieurs réponses immunitaires innées sont produites par une variété de protéines qui reconnaissent et interagissent avec des composantes spécifiques aux microbes. Ces protéines sont des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (*pattern-recognition receptors*, **PRRs**) qui se lient à une variété de ligands, soit les motifs moléculaires associés aux agents pathogènes (*pathogen-associated molecular patterns*, **PAMPs**) [13].

Les PAMPs sont hautement conservés parmi les micro-organismes. Elles sont généralement des structures invariables partagées par différentes classes de pathogènes. Leurs structures sont généralement cruciales pour l'intégrité, la survie et la pathogénicité des micro-organismes. Ainsi, un pathogène ne peut pas survivre en mutant ses PAMPs pour éviter les mécanismes de défense

de l'hôte. Des exemples de PAMPs incluent des glycoprotéines, des glycolipides, des lipopolysaccharides de bactéries gram-négatives, de l'ADN microbien non-méthylé et de l'ARN double brin d'origine virale [14].

Les PRRs sont aussi en mesure de détecter des signaux cellulaires intrinsèques de danger (*danger-associated molecular patterns*, **DAMPs**). Ces molécules, également appelées « alarmines », sont libérées lors d'un stress cellulaire et agissent comme des signaux de danger endogènes pour favoriser et amplifier une réponse inflammatoire [15]. Un exemple de DAMP inclut la protéine *high-mobility groupe box 1* (HMGB1) qui est impliquée dans l'organisation de l'ADN et la régulation de la transcription. Elle est passivement libérée par des cellules nécrotiques pour signaler aux cellules avoisinantes des dommages continus [16].

Il existe quatre familles de PRRs : les récepteurs Toll-like (TLRs), les récepteurs NOD-like (NLRs), les récepteurs RIG-1-like (RLRs) et les récepteurs C-type lectin (CLRs). Ces récepteurs sont exprimés sur plusieurs cellules immunitaires telles que les macrophages. La liaison des PAMPs et des DAMPs à leurs PRRs initie une cascade de signalisation conduisant à l'activation de facteurs de transcription comme le facteur nucléaire κ B (*nuclear factor*, NF- κ B) et les facteurs de régulation de l'interféron (*interferon regulatory factors*, IRFs). Ces gènes facilitent la production des cytokines pro-inflammatoires (comme TNF, IL-1, IL-6, IFN- γ), des protéines anti-microbiennes, des interférons de type I (IFN- α et IFN- β), des chimiokines ainsi que des protéines impliquées dans la modulation de la signalisation des PRRs. Une activation de la réponse immunitaire adaptative s'en suit [10].

1.2. Cellules NK

Documentées d'abord chez la souris par l'équipe de Kiessling et al. en 1975, les cellules NK ont été décrites comme des cellules « tueuses » avec un potentiel cytotoxique in vitro contre des cellules leucémiques. Comme leur nom l'indique, les cellules NK sont « naturellement » cytotoxiques et, contrairement aux LT cytotoxiques, ne nécessitent pas d'exposition préalable à un antigène pour produire leurs effets [17,18].

1.2.1. Développement et maturation fonctionnelle des cellules NK murines

Chez la souris, les cellules NK se développent dans des niches de moelle osseuse spécialisées. Les cellules souches hématopoïétiques pluripotents (*hematopoietic stem cells*, HSCs) donnent naissance à des progéniteurs lymphoïdes communs oligopotents (*common lymphoid progenitor*, CLP). L'origine cellulaire des cellules NK chez l'humain et la souris peut être retracée aux CLPs [19]. Le premier ancêtre cellulaire engagé de la lignée NK issu des CLPs est connu sous le nom de pré-pro NK, défini par l'expression de niveaux élevés du facteur de transcription *inhibitor of DNA binding 2* (Id2) et d'IL-7R (CD127) et par le manque d'expression de la plupart des marqueurs des cellules NK [20]. Celles-ci se différencient ensuite en progéniteurs NK (*NK progenitor*, NKP) [20]. Les NKP donnent naissance aux NK immatures (*immature NK*, iNK) qui quittent la moelle osseuse et intègrent la périphérie pour se développer en cellules NK matures (*mature NK*, mNK).

Dans les organes lymphoïdes périphériques, comme la rate et les ganglions, les cellules NK subissent une « maturation fonctionnelle », un processus par lequel elles acquièrent leurs fonctions effectrices de manière séquentielle. Cette maturation s'accompagne également de l'expression de différents marqueurs de surface cellulaire qui permettent à identifier différents sous-types de cellules mNK. Plus spécifiquement, elle peut être définie par l'expression différentielle de molécules de surface CD11b et CD27.

En 2003, Kim et al. ont fourni un aperçu des étapes de la maturation in vivo des cellules NK murines où elles ont été subdivisées selon une expression faible de CD11b (CD11b^{low}) ou élevée (CD11b^{hi}), divisant ainsi les cellules NK en sous-ensembles immatures et matures, respectivement. Contrairement aux cellules NK CD11b^{hi}, les cellules NK CD11b^{low} étaient de faibles inducteurs d'IFN- γ mais avaient un plus grand potentiel réplicatif précoce [21]. La protéine CD11b est exprimée sur de nombreuses cellules immunitaires innées telles que les monocytes, les macrophages et les cellules NK. Elle est impliquée dans de nombreux processus, dont l'adhésion et la migration cellulaire, la phagocytose, la chimiotaxie, l'activation et la cytotoxicité cellulaire [22].

En 2006, Hayakawa et al. ont subdivisé les cellules NK CD11b^{hi} en deux sous-ensembles selon l'expression de CD27. Membre la superfamille des récepteurs du facteur de nécrose tumorale (*tumour necrosis factor receptor*, TNFR), CD27 est exprimée sur les LT périphériques, les LB mémoire et les cellules NK [23]. Contrairement aux cellules CD27^{low}, le sous-ensemble CD27^{hi} avait une meilleure capacité proliférative, une plus grande capacité à produire de l'IFN- γ , une meilleure activité chimiotactique en réponse à des ligands de CXCR3 et une distribution tissulaire différente [24].

La compréhension de la maturation fonctionnelle a été encore plus raffinée en 2009 par Chiossone et al. Le groupe a cherché à mieux comprendre la relation développementale entre les sous-ensembles de cellules NK en utilisant une combinaison de quatre approches évaluant la cinétique d'apparition de chaque sous-ensemble de cellule NK au cours de leur développement, leur capacité proliférative, leur potentiel de différenciation in vivo et finalement leur profil d'expression génique. Les résultats ont abouti à un modèle de maturation en quatre étapes: 1) cellules NK CD11b^{low}CD27^{low} (ou cellules double-négatives, DN) \rightarrow 2) CD11b^{low}CD27^{hi} (ou cellules CD11b^{low}) \rightarrow 3) CD11b^{hi}CD27^{hi} (ou cellules double-positives, DP) \rightarrow 4) CD11b^{hi}CD27^{low} (ou cellules CD27^{low}). Il est important de noter que dans la littérature, CD11b^{low} est interchangé parfois avec CD11b⁻ et CD11b^{hi} correspond à CD11b⁺. La même logique s'applique à CD27. En comparant ces quatre populations, les cellules DN ont démontré le taux de prolifération le plus élevé, alors que les gènes impliqués dans la cytotoxicité des cellules NK, comme granzyme B et perforine, étaient relativement plus exprimés dans les cellules CD27^{low}. Ainsi, plus une cellule NK progresse à travers

les quatre stades de la maturation fonctionnelle, plus elle devient cytotoxique mais en perdant toutefois sa capacité de proliférer [25]. Les sous-types de cellules NK matures se retrouvent en différentes proportions chez la souris, entre autres dans les ganglions, la rate, le foie, le sang, la moelle osseuse et les poumons (figure 1) [26]. Dans la plupart des tissus, les cellules NK ne représentent qu'une minime fraction des lymphocytes totaux. Chez la souris, elle varie de 2% dans une rate à 10% dans les poumons. Chez l'humain, elle peut aller de 2% à 18% dans la circulation sanguine [27]. Le renouvellement des cellules NK murines et humaines dans le sang est d'environ 2 semaines [28,29].

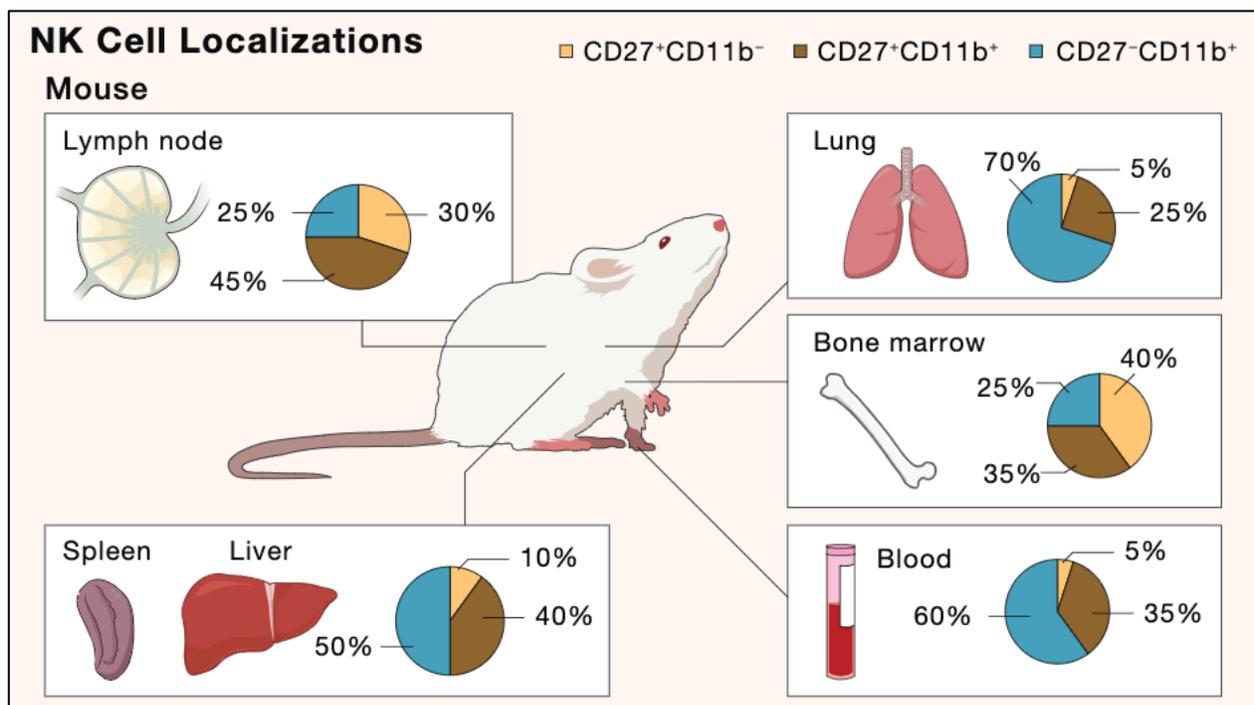


Figure 1. Proportions des sous-populations des cellules NK matures murines.

Le sous-type de cellule NK le plus mature, CD27⁻CD11b⁺, est le plus abondamment retrouvé dans la rate, le foie, le sang et les poumons. (Adapté de Cirnier et al., 2020) [26]

Une caractérisation plus détaillée du processus de maturation des cellules NK utilisant l'expression de plusieurs marqueurs de surface cellulaire outre CD11b et CD27 permet de

subdiviser en six stades (stades A à F). Les stades A, B et C incluent les cellules NK immatures. Elles progressent par la suite vers le stade D (CD27⁺CD11b⁻), ensuite vers le stade E (cellules DP, CD27⁺CD11b⁺) et finalement vers le stade F (le CD27⁻CD11b⁺) (figure 2) [30].

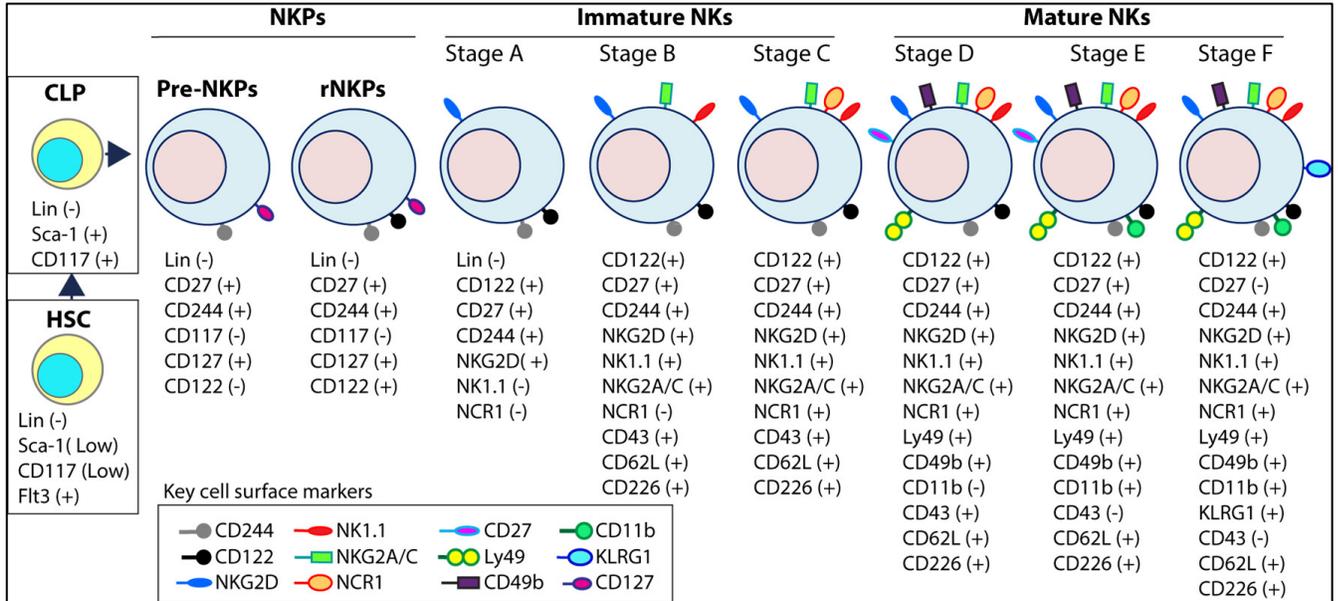


Figure 2. Stades de développement des NKPs, des cellules iNK et des mNK.

Les cellules HSCs (Lin⁻Sca⁺CD117⁺) se différencient en CLPs (Lin⁻Sca^{Low}CD117^{Low}Flt3⁺). L'expression du récepteur alpha d'IL-7 (IL-7R α) (CD127), CD27 et CD244 dénotent l'engagement des CLPs à devenir des précurseurs de pré-NK (Pré-NKPs). À leur tour, les Pré-NKPs deviennent des NKP raffinés (refined-NKPs, rNKP) et expriment l'IL-2R β (CD122). L'expression de NKG2D marque la conversion des rNKPs en cellules iNK. Les cellules NK progressant vers les iNKs expriment NK1.1 et NKG2A/C suivi de NCR1 (étapes A à C). La maturation terminale des cellules iNK en cellules mNK est définie par l'acquisition de différents récepteurs de la famille Ly49 (stade D). Les cellules NK qui atteignent la maturation terminale diminuent leur expression de CD27 et régulent à la hausse l'expression CD11b (stade E), puis le récepteur G1 de type lectine (*killer cell lectin-like receptor G1*, KLRG1) (stade F). Les cellules DN font partie des mNKs mais elles ne sont pas montrées dans cette figure. Leur position dans la différenciation est encore sous débat. (Adapté d'Abel et. al., 2018) [30]

1.2.2. Développement et maturation fonctionnelle des cellules NK humaines

Le développement et la maturation des cellules NK est surtout étudié chez la souris. En effet, l'accès aux organes lymphoïdes murins est facile et pratique, ce qui est plus difficile de faire chez l'humain. Avec l'amélioration des technologies utilisées en laboratoire, de grandes avancées ont été faites dans le monde des cellules NK humaines depuis les dernières années, permettant l'étude de leur ontogénie à partir, par exemple, du sang périphérique et du cordon ombilical. Les cellules NK humaines mûrent à la fois dans la moelle osseuse et dans les organes lymphoïdes secondaires comme les ganglions (figure 3) [31,32]. Dans le stade I, les cellules souches hématopoïétiques $\text{Lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD133}^+ \text{CD244}^+$ se différencient en progéniteurs multipotents à engagement lymphoïde (*lymphoid-primed multipotent progenitor*, LMPP) CD45RA^+ . Les LMPPs se transforment en Pro-B, Pre-T, NKPs ou d'autres ILCs. L'expression de la sous-unité β du récepteur de l'IL-2 (IL-2R β ou CD122) sur les CLPs marque leur engagement irréversible envers la lignée NK. L'acquisition de la protéine CD56 (*neural cell adhesion molecule*, NCAM) se fait durant la transition des iNKs vers les mNKs [30].

Les cellules NK matures peuvent être subdivisées en différents groupes avec des propriétés fonctionnelles distinctes selon l'expression de CD56 et CD16 [33]. En effet, les niveaux d'expression de CD56 fournissent une classification fonctionnelle des cellules NK humaines similaire à celle chez la souris marquée par la perte ou l'acquisition de CD11b/CD27. Contrairement aux cellules NK CD56^{dim} (expression faible de CD56), les cellules $\text{CD56}^{\text{bright}}$ sécrètent plus de cytokines et ont une expression élevée du récepteur inhibiteur NKG2A/CD94. À l'inverse, les cellules NK CD56^{dim} expriment CD16, ont plus de récepteurs de type KIR (*killer immunoglobulin-like receptors*), produisent de plus grandes quantités de granzyme et de perforine et ont un potentiel cytotoxique plus élevé que les cellules $\text{CD56}^{\text{bright}}$ [34,35]. La plupart des cellules NK humaines en circulation périphérique sont CD56^{dim} [36]. Ainsi, la maturation des cellules NK humaines peut être comparée à la maturation murine. En effet, chez la souris, au fur et à mesure qu'une cellule NK progresse à travers les 4 stades de la maturation fonctionnelle, elle perd de son potentiel à produire des cytokines, mais devient plus cytotoxique. Chez l'humain, les

cellules NK sont d'abord CD56^{bright} et produisent plus de cytokines, puis progressent vers le stade plus cytotoxique CD56^{dim}.

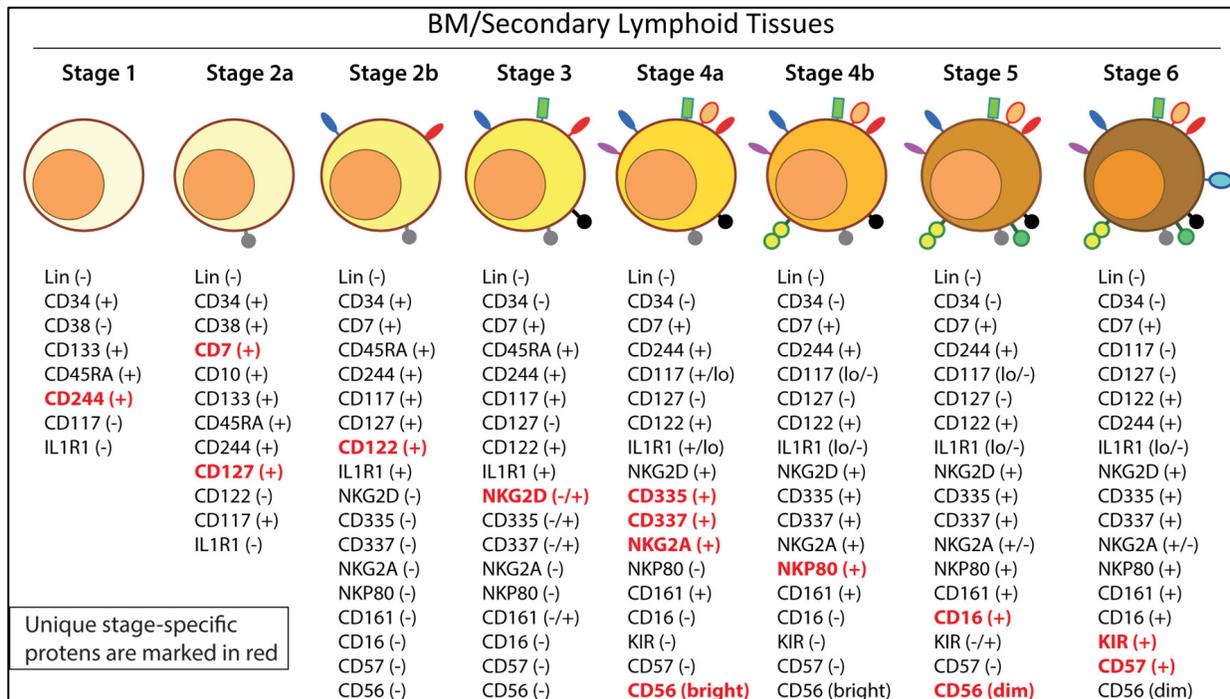


Figure 3. Représentation schématique du développement de cellules NK humaines dans la moelle osseuse et les ganglions lymphatiques.

Chez l'humain, six stades de développement distincts ont été décrits. Les stades 2 et 4 peuvent être subdivisés en 2a/2b et 4a/4b respectivement. Comme chez la souris, les cellules NK humaines expriment CD244 (2B4) tout au long du processus de développement à partir du stade 1 chez l'humain, et au stade des précurseurs des cellules pré-NKP, chez la souris. L'expression de CD7 et de CD127 suivi de CD122 définissent respectivement le stade 2a et le stade 2b. Le stade 2 représente les progéniteurs des cellules NK. Le stade 3 débute avec une augmentation de l'expression de NKG2D, CD335 (NKp46), CD337 (NKp30) et CD161 (NKR1P). Les étapes 4a et 4b définissent la transition des iNKs vers des mNKs avec l'acquisition de NKp80 au stade 4b. Les expressions de NKG2D, CD335, CD337 et CD161 atteignent leurs niveaux maximaux au stade 4. Les stades 4b et 5 sont différenciés par la diminution de l'expression du CD56 (CD56^{dim}), l'acquisition de CD16 (FcγRIIIA) et du récepteur KIR (CD158). L'étape 6, identifiée par des niveaux élevés de NKG2C, définit la génération de cellules NK « adaptatives » ou de type « mémoire » après une exposition antigénique. (Adapté d'Abel et al., 2018) [30]

1.2.3. Cellules pré-mNK murines

En 2006, Chan et al. ont décrit un type de cellule immunitaire, distinct de la lignée dendritique conventionnelle (*conventional dendritic cells*, cDCs) et plasmacytoïde (*plasmacytoid dendritic cells*, pDCs), mais avec des caractéristiques appartenant à la fois aux DCs et aux cellules NK [37]. En effet, cette cellule était capable de tuer ses cibles par des récepteurs activateurs appartenant à la famille des cellules NK comme NKG2D. Suite à sa stimulation, la cellule perdait de sa capacité cytotoxique tout en se dotant d'une capacité de présenter des antigènes grâce à l'expression de molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II. Dans la rate d'une souris, cette cellule manifestait surtout des fonctions apparentées à la lignée NK. En réponse à une infection systémique au virus de l'influenza, la cellule migrait vers les ganglions pour une présentation antigénique. Vu sa capacité de produire de grandes quantités d'IFN- γ , elle a été baptisée *interferon-producing killer DC* (IKDC). Dans la même année, le groupe de Zitvogel a démontré le remarquable potentiel anti-tumoral des IKDCs par des expériences de transfert adoptif [38]. Plus précisément, des souris préalablement traitées avec de l'interleukine-2 (IL-2) et du mésylate d'imatinib (Gleevec) ont été sacrifiées. Les IKDCs ont par la suite été isolées de leurs rates, puis injectées dans des souris Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-} (dépourvues de cellules NK, LB et LT) préalablement inoculées avec une lignée de mélanome murin. Contrairement aux cellules NK matures, les IKDCs avaient considérablement réduit la croissance tumorale. D'autres études ont corroboré le potentiel anti-tumoral des IKDCs sur d'autres modèles tumoraux tels que le lymphome et le rhabdomyosarcome [39,40]. Phénotypiquement, ces cellules expriment à leur surface CD11c, CD49b, B220, NK1.1 et MHCII [37,38]. Le groupe de Lesage a démontré par l'utilisation de souris congéniques que les proportions des IKDCs était intimement liée au chromosome 7 [41].

L'origine des IKDCs a été débattue dans la littérature dans les années suivantes. En 2012, le groupe de Lesage a redéfini ces cellules comme un intermédiaire dans la différenciation des cellules NK [42]. En effet, malgré leur transfert adoptif en présence de stimuli activateurs, les cellules NK B220⁻CD27⁺ et B220⁻CD27⁻ n'ont pas augmenté l'expression de B220. Ce dernier ne définissait donc pas un marqueur d'activation sur les cellules NK matures. À l'inverse, après leur

transfert, les cellules NK B220⁺ ont perdu rapidement l'expression de ce marqueur et ont acquis des caractéristiques phénotypiques des cellules NK plus matures. Ainsi, ces résultats ont placé les IKDCs comme un intermédiaire entre les iNKs et les mNKs. Elles ont donc été rebaptisées en cellules pré-mNKs (figure 4).

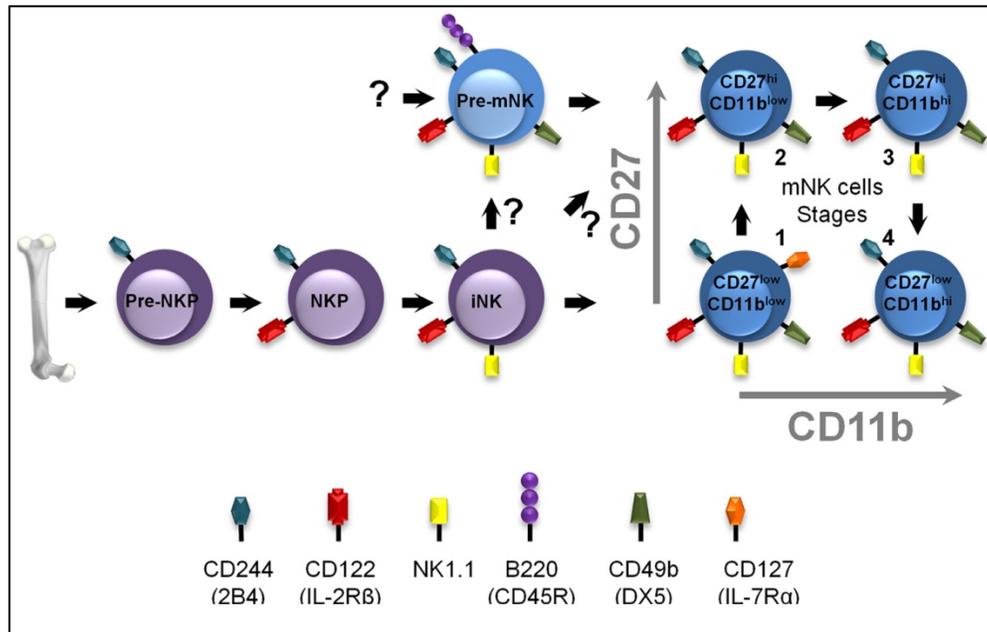


Figure 4. Positionnement des cellules pré-mNK dans la voie de différenciation des cellules NK.

Chez la souris, la différenciation des cellules NK est un processus qui s'effectue en plusieurs étapes dans lequel les intermédiaires cellulaires peuvent être distingués en fonction de l'acquisition et de la perte de l'expression d'antigènes de surface cellulaire spécifiques. La cellule pré-NKP représente le premier progéniteur engagé vers les cellules mNK. Les cellules pré-mNK sont positionnées comme un intermédiaire cellulaire entre les cellules iNKs et les cellules mNK. Les points d'interrogation représentent des étapes de différenciation qui doivent être encore vérifiés. (Adapté de Guimont-Desrochers et al., 2013) [43]

Un type de cellules NK présumée d'être l'équivalent des pré-mNKs a récemment été décrite chez l'homme, soit les cellules NK HLA-DR⁺ [44]. En effet, chez des patients atteints de différents types de cancers avancés et traités à l'IL-2 et au Gleevec, le nombre de ces cellules corrélait favorablement avec la survie sans progression et la survie globale des patients. Cela suggère donc que les cellules HLA-DR⁺ NK, comme les cellules pré-mNK murines, pourraient être dotées d'une forte activité anti-tumorale. Néanmoins, il reste à déterminer si les cellules HLA-DR⁺ NK représentent réellement l'équivalent humain des cellules pré-mNK murines.

1.2.4. Rôle des facteurs de transcription dans le développement des cellules NK

Le développement et la différenciation fonctionnelle des cellules NK est un processus très complexe qui est contrôlé par plusieurs facteurs de transcription (*transcription factors*, TFs). Les TFs impliqués dans la régulation de l'engagement vers la lignée NK incluent mais ne sont pas limités aux proto-oncogène Ets 1 (Ets1) [45,46], *Nuclear factor interleukin-3-regulated* (NFIL3) [47] et *Transcription factor T cell factor 1* (TCF1) [48]. Faisant partie de la famille *inhibitor of DNA binding* (Id), le TF Id2 est important pour la maturation des cellules NK et leur maintien à tous les stades de développement [49–51]. D'autres facteurs impliqués dans la maturation des cellules NK incluent *B lymphocyte-induced maturation protein 1* (BLIMP1) [52], T-bet [53], *Eomesodermin* (Eomes) [54] et *Kruppel-like factor 2* (KLF4) [55]. Le TF *GATA-binding protein 3* (GATA-3) influence à la fois la maturité et la cytotoxicité des cellules NK [56]. Les fonctions effectrices des cellules NK sont influencées par de nombreux TFs énumérés ci-dessus. Par exemple, il a été démontré que T-bet est associé à une augmentation de granzyme B et de perforine [54]. *Forkhead box protein O1* (FOXO1) a été proposé comme régulateur négatif de la cytotoxicité des cellules NK [57]. Le contrôle tumoral de ces cellules est déficient en absence de BLIMP1 et *Zinc finger protein Aiolos* [52,58]. Les cellules NK dont le TF *myeloid elf-1-like factor* (MEF) est absent ont une production de perforine et d'IFN- γ sévèrement affectée [59]. La manière dont ces divers facteurs agissent de concert et forment un réseau transcriptionnel n'est pas complètement élucidée. Une compréhension plus poussée de la régulation des cellules NK par les TFs dévoilera de meilleures stratégies pour améliorer le potentiel anti-tumoral des immunothérapies à base de cellules NK, mais dépasse le contexte de ce mémoire.

1.2.5. Rôle des cytokines dans le développement des cellules NK

Les cytokines, marqueurs inflammatoires jouant un rôle essentiel dans l'activation et la régulation de l'immunité adaptative et innée, contrôlent de multiples aspects des cellules NK. Tôt dans leur

développement, les cellules NKP expriment CD122, un récepteur à cytokine nécessaire à la signalisation d'IL-2 et d'IL-15, ce qui marque leur engagement à devenir des cellules NK [60]. De plus, elles nécessitent une signalisation à travers la chaîne gamma commune (*common gamma chain*, γ_c) pour leur développement, leur fonction et leur homéostasie (figure 5) [61]. La chaîne gamma (ou CD132) est une glycoprotéine transmembranaire qui s'associe à une chaîne alpha spécifique. Ensemble, ces deux sous-unités forment des récepteurs uniques pour IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 et IL-21. Les récepteurs de l'IL-2 et l'IL-15 diffèrent légèrement des autres complexes. En effet, ces cytokines se lient avec une haute affinité à des complexes de récepteurs hétérotrimériques plutôt que hétérodimériques. Ainsi, l'IL-2 se lie au complexe composé d'IL-2R α (CD25), d'une chaîne gamma et d'IL-2R β (CD122). De son côté, la sous-unité IL15-R α s'associe à une chaîne gamma et à IL-2R β (CD122) et lie l'IL-15. Lorsque la cytokine se lie à son récepteur, une transduction de signalisation empruntant la voie *Janus kinases/Signal transducers and activators of transcription* (JAK/STAT) s'en suit [30]. Les cellules NK nécessitent une signalisation via la sous-unité γ_c . Le nombre de cellules NK dans les souris dépourvues de la chaîne γ_c ($\gamma_c^{-/-}$) est extrêmement réduit et leurs fonctions sont très altérées [62,63]. À l'exception de l'IL-9, chacune des cytokines mentionnées ci-haut est impliquée jusqu'à un certain degré dans le développement ou la fonction des cellules NK [64–69].

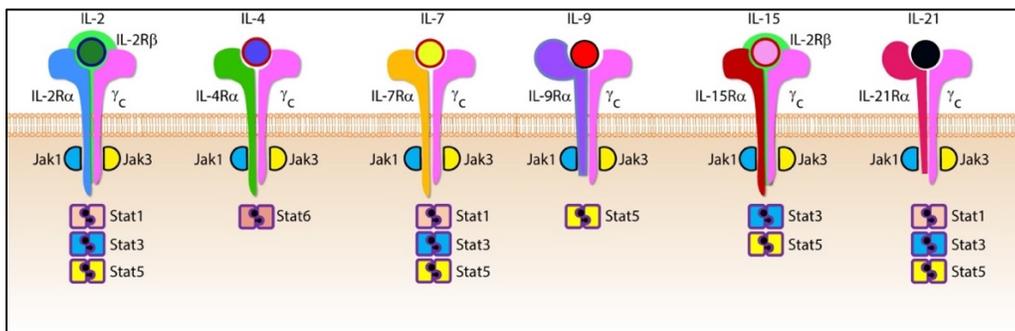


Figure 5. Le rôle des récepteurs composés de la sous-unité γ_c dans le développement des cellules NK.

La famille de récepteurs contenant une chaîne gamma commune est composée de six membres, soit l'IL-2R, l'IL-4R, l'IL-7R, l'IL-9R, l'IL-15R et l'IL-21R. Chacun d'eux se distingue des autres par leur association à des chaînes α uniques. L'IL-2R β est partagée par les complexes IL-2R et IL-15R pour former des complexes hétérotrimériques. Chez la souris, les NKP nécessitent l'IL-7R pour la différenciation des pré-NKP en rNKP. La voie JAK/STAT est empruntée après la liaison d'une cytokine à son complexe respectif. (Adapté d'Abel et al, 2018) [30]

1.2.6. Éducation des cellules NK

Ne nécessitant pas de reconnaissance antigénique pour appliquer ses fonctions, une cellule NK réussit tout de même à ne pas s'attaquer aux cellules du soi. Ceci est possible grâce à l'**éducation des cellules NK**, un processus par lequel une cellule NK est programmée pour sa réactivité. Ces effets peuvent être **CMH-dépendantes** ou **CMH-indépendantes**. Le processus d'éducation CMH-dépendant est appelé *licensing* [70] et peut être subdivisé en modèles d'**armement**, de **désarmement**, de **rhéostat** et de **réglage**. Dans le modèle d'armement, l'association des récepteurs inhibiteurs à la surface des cellules NK à des molécules présentées par le CMH-I du soi les rendent fonctionnelles. Celui du désarmement postule que les cellules NK qui sont dépourvues de récepteurs inhibiteurs et donc qui ne peuvent pas s'associer aux molécules du CMH-I du soi sont considérées « désarmées ». La stimulation chronique de ces cellules NK les rendent hyporéactives ou en état d'anergie [71]. Selon le modèle de rhéostat, les cellules NK qui expriment des niveaux plus élevés de récepteurs inhibiteurs spécifiques aux molécules de CMH-I sont plus immunoréactives que les cellules exprimant des niveaux plus faibles de récepteurs inhibiteurs [72,73]. Le modèle de réglage soutient que la réactivité des cellules NK varie selon les molécules du CMH-I [74]. Les modèles de rhéostat et de réglage complètent donc les modèles d'armement et de désarmement, suggérant que l'éducation des cellules NK n'est pas binaire (cellule soit réactive ou pas). Lorsque l'éducation est établie (armement/désarmement), elle peut être ajustée (rhéostat/réglage). Finalement, la tolérance du soi indépendante du CMH est possible grâce à l'expression de récepteurs inhibiteurs sur les cellules NK spécifiques à d'autres ligands, fournissant une source alternative d'inhibition [75,76].

1.2.7. Récepteurs des cellules NK

Les cellules NK en développement acquièrent un répertoire complexe de récepteurs activateurs et inhibiteurs. L'état d'activation global des cellules NK dépend de l'ensemble des ligands stimulants et inhibiteurs qu'une cellule cible lui présente, de la présence de récepteurs

spécifiques à ces ligands et finalement de l'équilibre entre ces signaux activateurs et inhibiteurs [77]. L'équilibre entre ces récepteurs est appelé tolérance envers le soi (*tolerance to self*). Elle est cruciale puisqu'il prévient la destruction des cellules saines du soi (figure 6). Parmi les **récepteurs activateurs** des cellules NK les plus dominants, on retient CD16 [78,79], la famille des récepteurs de cytotoxicité naturelle (*natural cytotoxicity receptors*, NCRs) incluant NKp46 (NCR1), NKp44 (NCR2) et NKp30 (NCR3) [80], NKG2D [81], 2B4 (CD244)[82] et DNAM-1 [83]. La signalisation de CD16 et les récepteurs NCRs est possible via des motifs d'activation des récepteurs immuns basés sur la tyrosine (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*, ITAM). La signalisation NKG2D passe par les protéines *DNAX-activating Protein 10* (DAP10) et DAP12 via des motifs de signalisation à base de tyrosine (YINM et ITAM respectivement) [84]. Les **récepteurs inhibiteurs** manifestent leurs effets par des ITIMs [75] et reconnaissent des molécules du CMH de classe Ia et Ib ainsi que d'autres ligands indépendants du CMH, comme CD48 et CEACAM1 [85]. Chez la souris, les récepteurs inhibiteurs s'associant aux ligands du CMH de classe Ia appartiennent à la famille Ly49. Le récepteur inhibiteur hétérodimérique NKG2A-CD94 s'associe quant à lui à la molécule Qa-1 du CMH de classe Ib [86].

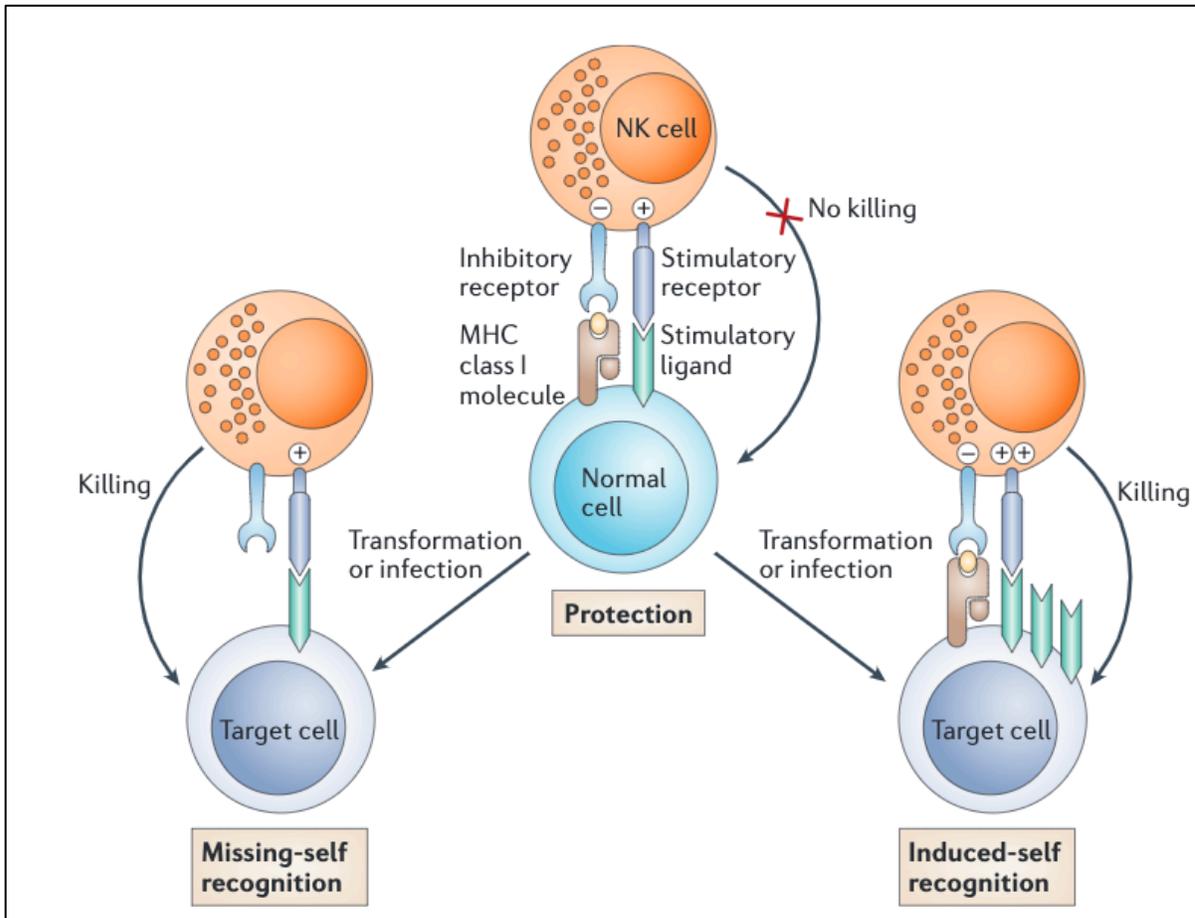


Figure 6. L'équilibre des signaux inhibiteurs et stimulants qu'une cellule NK reçoit détermine le type d'interaction avec sa cellule cible.

Lorsque les signaux délivrés par des ligands stimulants sont neutralisés par des signaux inhibiteurs provenant des molécules du CMH de classe I, un état d'équilibre s'installe et les cibles des cellules NK sont protégées. Si par contre une cellule cible perd l'expression de ses propres molécules du CMH de classe I, comme dans un contexte néoplasique ou infectieux, les signaux de stimulation délivrés par la cellule cible deviennent dominants, ce qui entraîne une activation des cellules NK et une lyse des cellules cibles (*missing-self recognition*). Similairement, des contextes pathologiques comme la transformation maligne ou l'infection peuvent également induire l'expression de ligands stimulants de telle sorte que l'inhibition délivrée par les récepteurs inhibiteurs est surmontée (*induced-self recognition*). En réalité, il est probable que ces deux mécanismes fonctionnent simultanément. (Adapté de Raulat et al. 2006) [71]

1.2.8. Fonctions des cellules NK

1.2.8.1. Mécanismes de cytotoxicité

Les mécanismes moléculaires qui régulent la cytotoxicité des cellules NK ont été exhaustivement décrits dans la littérature. Elles consistent en 1) la reconnaissance de la cellule NK de sa cellule cible, puis 2) son contact avec cette cellule pour former une synapse immunologique (SI) et finalement 3) l'induction de la mort cellulaire. Les mécanismes de reconnaissance d'une cellule cible sont décrits dans la section précédente (récepteurs des cellules NK). Une fois reconnues, les cellules NK sont capables d'induire l'apoptose des cellules cibles grâce à trois mécanismes.

Le premier mode d'apoptose est possible grâce à des **granules cytotoxiques**. Les cellules NK stockent des molécules dans ces granules. Lors du premier contact, les molécules d'adhésion telles que LFA-1 (*lymphocyte fusion-associated antigen-1*), CD2 et CD11b permettent la liaison étroite de la cellule NK à sa cellule cible [87]. C'est la première étape pour former une SI. Des événements de réorganisation du cytosquelette de la cellule NK s'en suivent, incluant une polymérisation de l'actine à la SI [88,89] et la polarisation du centrosome ou le centre cellulaire organisateur des microtubules, COMT (MTOC en anglais pour *microtubule organizing center*) vers la cellule cible [90]. Ainsi, les granules lytiques polarisées se déplacent le long des microtubules et, une fois à la synapse, fusionnent avec la membrane cellulaire cible et libèrent des enzymes cytotoxiques [91,92]. Lors de la dégranulation des cellules NK, les protéines CD107a (*lysosomal-associated membrane protein-1*, LAMP-1) et CD107b (LAMP-2) apparaissent transitoirement à la surface cellulaire. Ces protéines peuvent donc être utilisées dans des expériences comme marqueurs de dégranulation et servent de mesures indirectes de la fonction cytolytique des cellules NK [93]. Les molécules contenues dans les granules incluent la perforine et les granzymes. La perforine est une glycoprotéine qui se polymérise et qui forme des pores sur sa cellule cible, perturbent sa membrane cellulaire et facilitant l'influx d'ions et de polypeptides comme les granzymes [94]. Les granzymes B, par exemple, sont des protéases qui, une fois pénétrées dans une cellule cible, déclenchent l'apoptose par des mécanismes dépendants de la caspase [95,96].

La granzyme B peut également induire l'apoptose par la libération du cytochrome C mitochondrial par la protéolyse de la protéine pro-apoptotique BID [97].

Un deuxième mécanisme de cytotoxicité implique l'activation des **récepteurs de la mort** présents à la surface de la cellule cible. Les ligands de ces récepteurs font partie de la famille du facteur de nécrose tumorale (*tumour necrosis factor*, TNF) et incluent le ligand d'induction apoptotique relié au TNF (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*, TRAIL) et le ligand FASL (FASL ou CD95L ou CD178) [98]. L'engagement du récepteur de la mort avec son ligand apparenté induit un changement conformationnel du récepteur, ce qui mène au recrutement de protéines adaptatrices qui enchaînent avec une cascade d'évènements caspase-dépendantes jusqu'à l'apoptose des cellules cibles [99]. La sensibilité d'une cellule cible à ces ligands est régulée par différents paramètres, comme le degré d'expression des récepteurs correspondants sur des cellules cancéreuses et la présence de mécanismes intracellulaires protecteurs contre l'apoptose [100]. Par exemple, dans un modèle expérimental murin, l'administration d'anticorps monoclonaux neutralisant TRAIL augmente significativement les métastases hépatiques de plusieurs lignées cellulaires tumorales sensibles à ce ligand [101]. Un autre exemple revêtant l'importance de TRAIL dans le contrôle tumoral a été démontré par Cretney et al. qui ont inoculé des souris TRAIL^{-/-} avec la méthylcholanthrène (MCA), un agent chimique hautement cancérigène. Contrairement à leurs homologues sains, les souris déficientes en TRAIL ont développé un fibrosarcome beaucoup plus rapidement [102]. Les cellules NK sont capables de lyser des cellules cancéreuses en modulant à la hausse l'expression de FAS sur des cellules qui normalement ne l'expriment pas, comme c'est le cas pour la lignée tumorale RMA-S. Une inhibition de la signalisation de FASL par la protéine FLIP (*FLICE-inhibitory protein*), à l'inverse, accélère la progression tumorale in vivo [103]. Ensemble, ces études démontrent l'importance du mécanisme d'apoptose causée par les récepteurs de la mort que les cellules NK utilisent pour manifester leurs effets anti-tumoraux.

Le troisième mécanisme est la **cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps** (*antibody-dependent cellular cytotoxicity*, ADCC). Les cellules « stressées » comme les cellules tumorales peuvent être opsonisées par des anticorps, typiquement des IgGs, produites par les LB. Ces immunoglobulines contiennent deux régions, soit Fab (*Fragment antigen-binding*) et Fc (*fragment crystallizable region*). La région Fab se lie à l'antigène d'une cellule cible. Le segment

Fc est reconnu par un récepteur sur une cellule effectrice. Sur la cellule NK, ce récepteur est CD16 (FcyRIII). Suite à cette liaison Fc-CD16, la cellule NK libère des facteurs cytotoxiques qui provoquent la mort de la cellule cible. Ainsi, l'ADCC est un mécanisme unique joignant les immunités innée et adaptative [104].

1.2.8.2. Sécrétion de cytokines

Les cellules NK produisent une grande variété de cytokines pro-inflammatoires telles qu'IFN- γ , le TNF- α et l'IL-10. Elles sécrètent des cytokines immunosuppressives comme GM-CSF (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*), G-CSF (*granulocyte colony-stimulating factor*) et l'IL-3 et de nombreuses chimiokines, dont CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP1-a), CCL4 (MIP1-b), CCL5 (RANTES), XCL1 (lymphotactine) et CXCL8 (IL-8) qui permettent la migration des cellules immunitaires aux tissus lésés et inflammatoires [105,106].

Parmi les cytokines sécrétées par les cellules NK, l'IFN- γ en est une très puissante. Sa libération, tout comme celle de TNF- α , est distincte de la sécrétion des granules cytotoxiques. En effet, ces deux cytokines transitent via l'endosome de recyclage (*recycling endosome*, RE) et sont livrés à plusieurs sites sur la surface cellulaire de manière non-polarisée contrairement à la perforine [107]. L'IFN- γ joue un rôle crucial dans l'activité anti-virale, anti-bactérienne et anti-tumorale des cellules NK. Elle module l'expression de la caspase, FASL et TRAIL [108]. Elle peut contrôler la prolifération cellulaire et la sensibilité des cellules cibles à l'apoptose, promouvoir l'activité bactéricide des phagocytes et bloquer l'angiogenèse en contexte tumoral [100]. Les cytokines, en plus d'augmenter la cytotoxicité des cellules NK, ont un rôle immunorégulateur. En effet, l'IFN- γ peut stimuler la présentation antigénique en augmentant les molécules du CMH de classe I et II sur plusieurs types de cellules [100]. L'IFN- γ et le TNF- α façonnent les DCs en tuant les DCs immatures via le récepteur activateur Nkp30 ou promouvant leur maturation, ce qui améliore aussi la présentation d'antigènes pour les LT [105,106]. En contexte tumoral, la production d'IFN- γ par des cellules saines avoisinantes peut stimuler les cellules NK à produire, à leur tour, des cytokines. Par exemple, Marcus et al. ont prouvé que la guanosine monophosphate-adénosine

monophosphate cyclique (*cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate*, cGAMP) produite par des cellules tumorales déclenche l'activation de la voie STING (*stimulator of interferon genes*) dans des cellules saines du microenvironnement tumoral. Cela mène à la production d'IFN- γ par ces cellules qui activent à leur tour les cellules NK [109].

En conclusion, les fonctions effectrices des cellules NK décrites ci-haut sont les principaux mécanismes par lesquels elles assurent une immunité précoce et efficace (figure 7).

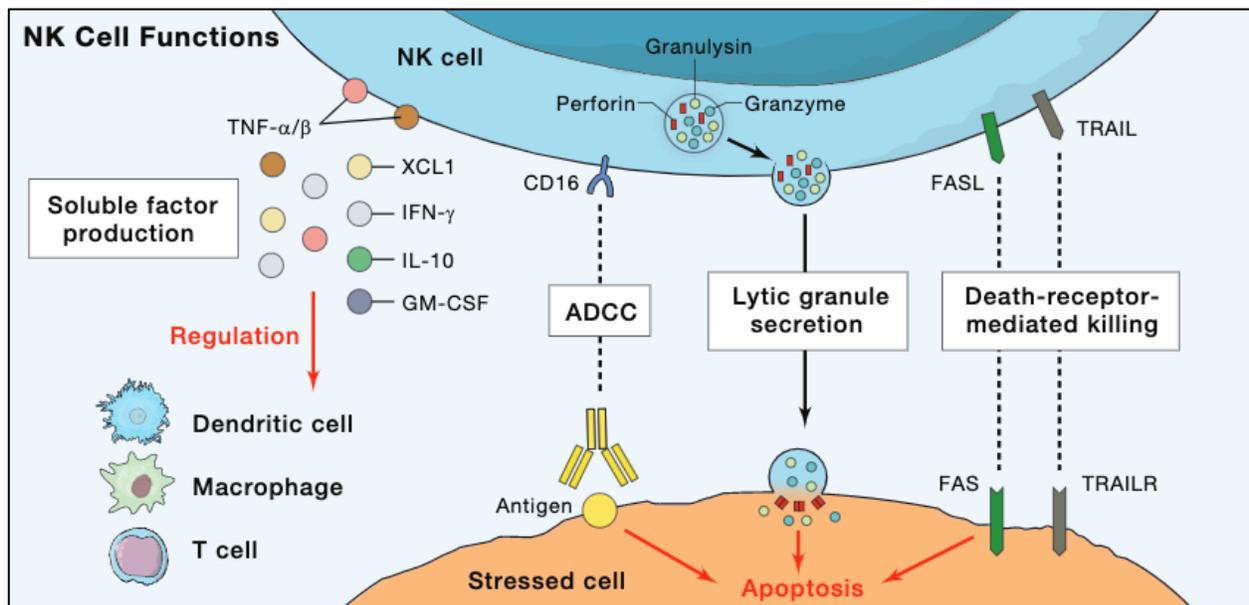


Figure 7. Fonctions des cellules NK.

Les cellules NK produisent des granules lytiques contenant plusieurs molécules (perforine et granzymes) pouvant induire l'apoptose des cellules « stressées ». Elles expriment plusieurs membres de la superfamille du TNF tels que FASL et TRAIL, qui, lorsqu'associés à leurs récepteurs correspondants (FAS et TRAILR respectivement), induisent l'apoptose des cellules cibles. Les cellules NK produisent aussi des cytokines comme l'IFN- γ , le TNF- α , l'IL-10, le GM-CSF et plusieurs chimiokines (CCL3, CCL4, CCL5, XCL1). Les cellules NK peuvent également façonner la réponse immunitaire en interagissant avec les cellules dendritiques, les macrophages et les lymphocytes T. (Adapté de Crinier et al.) [26]

1.2.9. Cellules NK en contexte tumoral

À ce jour, il existe plusieurs fonctions des cellules NK qui ne sont pas entièrement élucidées. Ces cellules sont impliquées dans plusieurs contextes, allant de l'auto-immunité [110] et la régénération tissulaire [111] au contrôle des infections virales, bactériennes et fongiques [112–116] et la croissance tumorale. Cette section se concentre le rôle des cellules NK en contexte tumoral.

Il existe d'innombrables évidences soulignant le rôle anti-tumoral des cellules NK à différentes étapes de la progression des cancers. Chez la **souris**, elles agissent contre l'**initiation** et la **croissance** tumorale ainsi que sur la progression des **métastases**. Les premières évidences de rejet tumoral par les cellules NK datent déjà depuis quelques décennies. En 1980, Riccardi et al. ont démontré par des expériences murines in vivo que la clairance systémique des lignées tumorales Yac-1 et RBL-5 radiomarquées de la rate, le foie et les poumons corrèle avec les niveaux de réactivité des cellules NK [117]. Quelques années plus tard, Gorelik et ses collègues ont prouvé avec des expériences de transfert adoptif que l'activité des cellules NK peut interférer avec l'induction de la leucémie dans des souris irradiées [118]. Un an plus tard, conformément à la théorie de manque de reconnaissance de soi (*missing-self recognition*), il a été démontré que les cellules NK tuent spontanément les cellules tumorales déficientes en CMH de classe I dans des essais in vitro [119]. Plusieurs autres études ont renforcé davantage le rôle anti-tumoral des cellules NK dans les décennies suivantes. Outre le rôle des cellules NK dans la protection murine contre des tumeurs spontanées (et donc l'initiation et la croissance tumorale) comme le sarcome provoqué par la MCA [120], elles participent activement dans l'immunosurveillance des métastases. Par exemple, la déplétion iatrogénique des cellules NK dans des souris SCID augmente la croissance de métastases hépatiques suite à l'injection intraveineuse de la lignée de mélanome murin B16F10 [121].

Chez l'**humain**, les cellules NK ont un rôle de premier plan dans le contrôle des **cancers hématologiques malins** [122,123] et des **métastases** [124]. Cependant, ce rôle dans la croissance des tumeurs solides primaires chez l'humain reste un sujet de débat [124]. Par ailleurs,

l'infiltration intra-tumorale des cellules NK corrèle favorablement avec le pronostic oncologique de plusieurs cancers comme le cancer gastrique [125], de l'œsophage [126] et pancréatique [127]. Les cellules NK peuvent également prédire la résistance au traitement anti-néoplasique. Dans l'étude de Mariel et al., une diminution de l'infiltration des cellules NK dans le microenvironnement du tissu tumoral mammaire est un marqueur prédictif de l'échec à la chimiothérapie adjuvante [128]. Ainsi, bien que la fonction des cellules NK murines s'applique au contrôle tumoral de son initiation à sa dissémination, la littérature actuelle chez l'humain semble suggérer qu'elles jouent un rôle prédominant dans le contrôle des métastases et des cancers hématologiques. Par contre, leur rôle précis dans l'immunosurveillance des tumeurs solides primaires reste à étudier. De manière intéressante, les cellules NK peuvent effectuer leurs effets anti-tumoraux indirectement à travers leur contrôle viral. La meilleure évidence de ce lien est probablement la déficience héréditaire en cellules NK (*NK cell deficiency*) qui prédispose les humains à des virus tels que le virus du papillome humain, le virus herpès simplex et le cytomégalovirus et conséquemment à des transformations néoplasiques dérivées de ces virus [129].

Malgré les mécanismes d'évasion immunitaire que les cellules cancéreuses utilisent pour s'échapper aux cellules NK (figure 8), plusieurs études ont exploité le potentiel anti-tumoral des cellules NK. Les cellules NK des patients atteints de cancer sont généralement moins fonctionnelles, en partie en raison de l'altération du répertoire de récepteurs à leur surface [124]. Tel que mentionné précédemment (section Rôle des cytokines dans le développement des cellules NK), plusieurs cytokines promeuvent la différenciation, la survie et la prolifération des cellules NK. Ainsi, la première stratégie immunothérapeutique consiste à administrer des **cytokines** in vivo pour améliorer le nombre et les fonctions des cellules NK autologues. Ensuite, l'incubation in vitro de cellules NK avec une ou plusieurs cytokines afin d'en augmenter le nombre et/ou les activer en *lymphokine-activated killers* (LAKs) peut être effectuée, suivi d'un transfert adoptif chez un sujet atteint de cancer [130]. À titre d'exemple, l'IL-2 est la première cytokine approuvée pour une utilisation chez les patients. Par contre, son efficacité est mitigée et, à hautes doses, elle peut provoquer des fuites capillaires et d'autres effets secondaires graves [131]. Ceci a mené au développement de formes alternatives de l'IL-2, comme sa forme mutante *super-2* qui

a une affinité accrue pour la sous-unité IL-2/15R β sur les cellules NK et présente une efficacité anti-tumorale in vitro [132]. D'autres cytokines telles qu'IL-12, IL-15, IL-18 et IL-21 ont également été testés dans des modèles précliniques et des études de phase II. Bien qu'en théorie l'activation des cellules NK par ces cytokines soit une avenue thérapeutique prometteuse, leur efficacité en pratique est limitée, ce qui a mené au développement d'autres stratégies [130].

Il existe trois types de traitements par des anticorps pour potentialiser les effets des cellules NK. Ces traitements se basent sur leur capacité à faire de l'**ADCC**, sur des **inhibiteurs de points de contrôle immunitaire** (*immune check-points*) ou le blocage des **récepteurs inhibiteurs des cellules NK** et sur des **agents bi- ou tri-spécifiques** (*bi- and tri-specific killer engagers, BiKEs and TriKEs*). Par exemple, dans une étude préclinique sur un modèle de leucémie myéloïde, un anticorps monoclonal dirigé contre CD133 (retrouvé normalement en grand pourcentage chez des patients leucémiques) avait été modifié pour augmenter son affinité pour CD16, potentialisant ainsi l'ADCC par les cellules NK [133]. Le Monalizumab, un anticorps anti-NKG2A humanisé, est un exemple d'inhibiteur de point de contrôle immunitaire. Le blocage du récepteur inhibiteur NKG2A améliore l'immunité tumorale en stimulant à la fois les fonctions effectrices des lymphocytes T CD8⁺ et des cellules NK autant chez la souris et que chez l'homme. Des données préliminaires d'une étude clinique de phase II combinant le Monalizumab et le Cetuximab (un anticorps dirigé contre le facteur de croissance épidermique) chez des patients atteints de carcinome épidermoïde ont démontré une réponse partielle chez 31%, une stabilité chez 54% et une progression chez 11% de patients avec des effets secondaires surtout légers (fatigue, fièvre et céphalées) [134]. Un autre point de contrôle est CD137. Son expression est induite par Trastuzumab, un anticorps humanisé contre HER2 (*human epidermal growth factor 2*). Comparé à son administration seule, la combinaison de Trastuzumab avec un anticorps anti-CD137 pour le traitement des cancers du sein HER2+ améliore la cytotoxicité des cellules NK in vitro et in vivo [135]. Finalement, les BiKEs and TriKEs sont des anticorps modifiés qui lient des récepteurs des cellules NK à une extrémité et des antigènes tumoraux à l'autre, renforçant la liaison entre la cellule tumorale et la cellule effectrice [136]. Par exemple, chez l'humain, le traitement in vitro de cellules myélodysplasiques avec le BiKE CD16 x CD33 augmente la dégranulation des cellules NK et leur production d'IFN- γ et de TNF α [137].

D'autres immunothérapies se basent sur le **transfert adoptif** et incluent l'utilisation de **cellules NK allogéniques ou autologues**, c'est-à-dire provenant du sang d'un donneur sain ou du patient lui-même. Cette stratégie a déjà été évaluée dans des essais cliniques de phase I ou de phase II sur des patients à haut risque ou réfractaires aux traitements conventionnels comme la chimiothérapie. En raison de différences dans les stratégies de séparation, d'expansion et d'activation des cellules NK en laboratoire, les résultats des études cliniques sont variables [130]. Les **cellules souches** sont une autre source de cellules NK. Par exemple, elles peuvent être retirées du sang de cordon ombilical. Leur effet a été testé dans des essais précliniques ou cliniques contre la leucémie myéloïde aiguë (LMA) et des syndromes myélodysplasiques [138]. Les **lignées cellulaires** NK génétiquement modifiées représentent également un outil thérapeutique puissant. La lignée NK-92, entre autres, possède des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles similaires à celles des cellules NK. Elle est la seule lignée cellulaire approuvée par la Food and Drug Administration (FDA). Malgré ces effets hautement cytotoxiques contre des cellules tumorales démontrées dans des études précliniques, leur efficacité en clinique est minimale [139]. Malgré tout, l'utilisation de lignées cellulaires comme thérapies allogéniques demeure intéressante et pourrait un jour être facilement produite et accessible (*off-the-shelf*). Récemment, la manipulation génétique *ex vivo* des cellules NK s'est concentrée sur l'expression des **récepteurs antigéniques chimériques** (*chimeric antigen receptors, CARs*) qui permettent aux cellules de mieux reconnaître leurs cibles. Les cellules NK offrent une alternative intéressante aux LT pour la génération des CARs pour quelques raisons. D'abord, l'infusion allogénique de cellules NK provoque nettement moins de réactions du greffon contre l'hôte (*graft-versus-host disease, GvHD*) chez la souris et l'homme [140,141]. Ensuite, les cellules NK matures ont une durée de vie relativement plus courte que celle des LT, permettant ainsi une activité anti-tumorale tout en limitant les effets secondaires [142]. La dernière raison est plutôt théorique. Les cellules CAR-NK, grâce à leurs récepteurs natifs, conservent leur capacité intrinsèque à reconnaître les cellules tumorales. Ainsi, contrairement aux cellules CAR-T, sachant que le microenvironnement tumoral peut diminuer l'expression de l'antigène ciblé par le CAR, il est théoriquement moins probable que les cellules tumorales échappent à l'immunosurveillance des cellules NK [143]. Finalement, les **vésicules extra-cellulaires** (*extracellular vesicles, EVs*) ont été explorées dans les dernières

années pour leur potentiel thérapeutique. Elles sont de taille nanométrique et sont sécrétées par de nombreuses cellules immunitaires dont les cellules NK. Elles contiennent des substances bioactives comme des acides nucléiques, des lipides et des protéines. Leur effet anti-néoplasique a été testé dans quelques modèles tumoraux précliniques. Cependant, les mécanismes sous-jacents à la destruction des cellules tumorales par les EVs des cellules NK restent à élucider [144].

En bref, l'utilisation de cellules NK comme forme d'immunothérapie (figure 9) a été largement essayée dans plusieurs essais cliniques pour différents cancers, incluant la LMA et la LMC, le cancer du sein, le mélanome, le cancer de l'ovaire, le neuroblastome, le carcinome rénal, le cancer hépatocellulaire et le cancer colorectal [145]. Notre compréhension de la biologie de ces cellules évolue rapidement et nous permet de les exploiter pour le développement de nouvelles stratégies immunothérapeutiques.

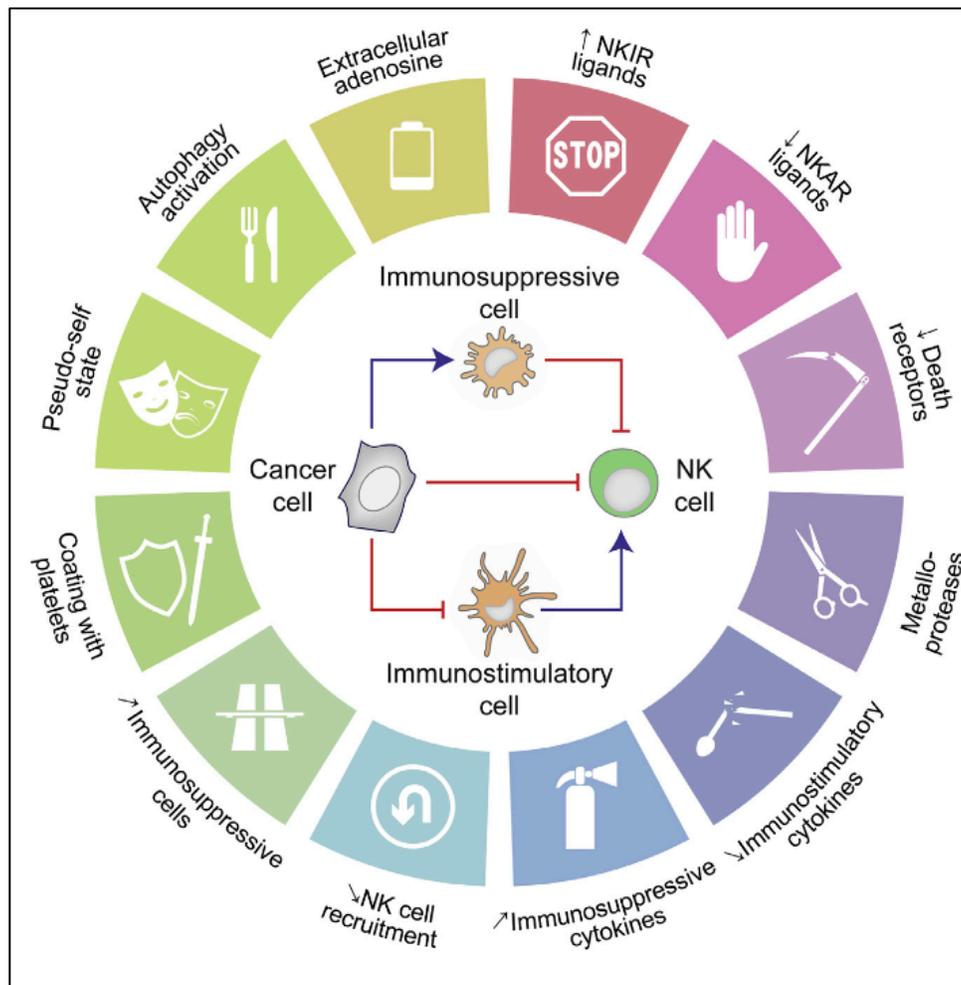


Figure 8. Mécanismes d'évasion des cellules cancéreuses des cellules NK.

Les cellules malignes évitent leur reconnaissance et leur élimination par les cellules NK par de multiples mécanismes qui agissent directement sur les cellules NK, par le biais des cellules immunosuppressives ou par l'inhibition des cellules immunostimulatrices. Ces mécanismes comprennent 1) l'augmentation de l'expression des ligands des récepteurs inhibiteurs des cellules NK; 2) la diminution des ligands des récepteurs activateurs des cellules NK; 3) la régulation négative des récepteurs de la mort; 4) la sécrétion de métalloprotéinases qui génèrent des ligands inhibiteurs solubles; 5) la diminution de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires; 6) l'augmentation de la sécrétion de cytokines immunosuppressives; 7) la diminution du recrutement des cellules NK; 8) l'augmentation du recrutement des cellules immunitaires immunosuppressives; 9) le revêtement physique des cellules tumorales avec des plaquettes; 10) l'acquisition d'un état mimant une cellule du soi; 11) la synthèse extracellulaire d'adénosine en réponse à l'hypoxie et 12) l'activation de l'autophagie secondaire à l'hypoxie. (Adapté de López-Soto et al., 2017) [124]

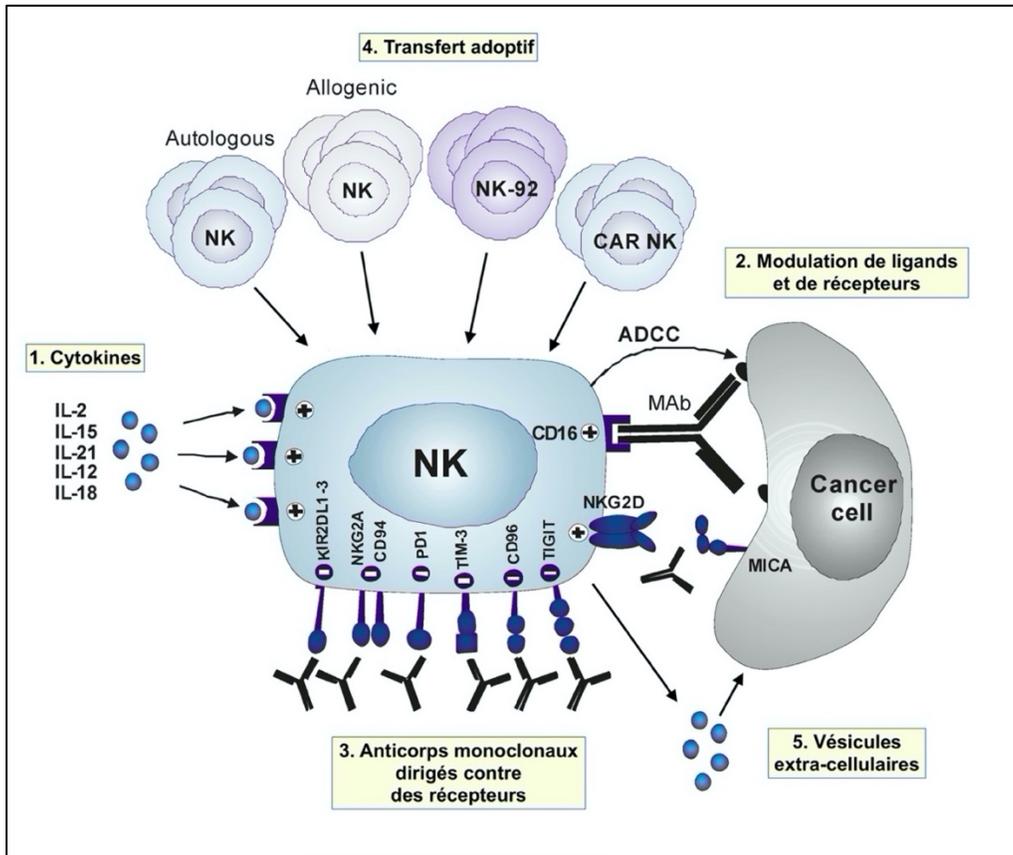


Figure 9. Approches thérapeutiques pour restaurer le potentiel anti-tumoral des cellules NK.

1) Cytokines : l'activité antitumorale des cellules NK peut être stimulée par des cytokines telles que l'IL-2, l'IL-12, l'IL-15 et l'IL-18; 2) Modulation de ligands et de récepteurs : les approches thérapeutiques qui engagent les récepteurs d'activation des cellules NK sont utilisées en clinique et incluent des anticorps monoclonaux (mAbs) dirigés contre CD16 qui induisent l'ADCC. Le Trastuzumab ou le Cetuximab sont les mAbs les plus utilisées pour augmenter l'activité tumoricide des cellules NK. Les anticorps dits bi-spécifiques et tri-spécifiques (BiKEs/TriKEs) peuvent également améliorer l'ADCC en redirigeant les cellules NK et les cellules T contre les cellules tumorales. Cibler d'autres récepteurs d'activation des cellules NK (comme NKG2D) ou leurs ligands (comme la séquence A liée au polypeptide du CMH de classe I (MICA)) sont également des stratégies prometteuses; 3) Anticorps monoclonaux dirigés contre des récepteurs : en ciblant des récepteurs inhibiteurs ou des protéines de contrôle immunitaire, le potentiel anti-tumoral des cellules NK est grandement amélioré. Des exemples incluent : les KIRs, NKG2A, PD-1/PD-L1, TIM-3, CD96 et TIGIT; 4) Le transfert adoptif de cellules autologues, allogéniques, de lignées (NK-92) et de cellules NK modifiées (CAR-NKs) représentent également une approche thérapeutique; 5) Sécrétées par les cellules NK, les vésicules-extra-cellulaires contenant des substances bioactives peuvent être dirigées contre les cellules cancéreuses et manifester ainsi leurs propriétés anti-tumorales (Adapté de Lorenzo-Herrero et al., 2018) [146]

1.2.10. Cellules NK : système immunitaire inné, adaptatif ou les deux?

La mémoire immunologique est considérée comme l'une des caractéristiques cardinales du système immunitaire adaptatif [147]. Elle peut être définie comme une réponse immunitaire quantitativement et qualitativement améliorée suite à une deuxième stimulation immunitaire [148]. La cellule NK est historiquement classée comme une composante du système immunitaire inné. Or, depuis les dernières années, des études prouvent que les cellules NK sont dotées d'une réponse mémoire, accordant une vision plus nuancée à la classification de ces cellules [105].

La première évidence de l'existence de cellules NK de type « mémoire » (*memory-like NK cells*) remonte à 2006 [149]. Dans leur étude, O'Leary et al. se sont servis du modèle d'hypersensibilité de contact induite par un haptène (*hapten-induced contact hypersensitivity, CHS*) qui est un exemple classique d'immunité adaptative. Le groupe a constaté que des souris $Rag2^{-/-}$, dépourvues de LB et de LT, développent une dermatite de contact (un type de réponse d'hypersensibilité allergique) importante suite à l'exposition au 2,4-dinitrofluorobenzène et à l'oxazolone. Cette réponse d'hypersensibilité dure au moins quatre semaines. Elle est absente chez la souris $Rag2^{-/-}$ déplétée de cellules NK et chez la souris $Rag2IL2rg^{-/-}$ (dépourvue en LB, LT et cellules NK). Ces observations indiquent donc que les cellules NK peuvent induire des réponses mémoire spécifiques à un antigène, et ce, en absence LB et de LT [149]. Trois ans plus tard, Sun et al. ont observé qu'une exposition préalable au MCMV protège les souris $Rag2^{-/-}$ (dépourvues de cellules B et T) d'une deuxième exposition au même virus mais à une dose létale [150]. Les réponses « mémoires » des cellules NK ont même été observées en l'absence d'un antigène spécifique. À titre d'exemple, les cellules NK de la lignée murine $Rag1^{-/-}$ produisent des niveaux élevés d'IFN- γ in vitro en présence d'un mélange de cytokines composé d'IL-2, d'IL-15 et d'IL-18. Une à trois semaines après leur transfert dans des souris naïves, les cellules NK préalablement stimulées retournent à leur état basal. Suite à une stimulation subséquente, les cellules NK injectées sont capables de produire significativement plus d'IFN- γ comparées aux cellules NK de l'hôte. Ces expériences suggèrent que les cellules NK présentent une réponse mémoire induite par les cytokines [151]. Ainsi, les cellules NK ont des fonctions biologiques sophistiquées qui appartiennent à la fois au système immunitaire inné et adaptatif.

1.3. Intégrines

Les intégrines sont des récepteurs transmembranaires qui facilitent l'adhésion d'une cellule à la matrice extracellulaire (*extracellular matrix*, ECM), un réseau de protéines que les cellules sécrètent et moulent dans l'espace intercellulaire. Les intégrines se lient à variété de ligands tels que la fibronectine, les collagènes, la vitronectine et les laminines. Les liaisons activent des voies de signalisation régulant plusieurs aspects cellulaires comme la réorganisation du cytosquelette intracellulaire, le déplacement de nouveaux récepteurs vers la membrane cellulaire et même le cycle cellulaire. Les intégrines sont composées de deux sous-unités formant un hétérodimère par une liaison non-covalente, soit alpha (α) et bêta (β). À ce jour, 18 sous-unités α et huit sous-unités β ont été décrites [152]. Alors qu'il n'est pas faux d'imaginer qu'il existe plusieurs combinaisons possibles, en réalité, les combinaisons $\alpha\beta$ sont plus restreintes. En effet, chaque sous-unité α ne peut se lier qu'à une seule sous-unité β [153]. Ainsi, chez les vertébrés, 24 intégrines différentes peuvent être formées (figure 10) [152] et chaque combinaison $\alpha\beta$ a sa propre spécificité de liaison et ses propres propriétés de signalisation [154]. De plus, les intégrines sont omniprésentes; elles existent dans toutes les cellules nucléées, sont souvent nombreuses et plusieurs membres peuvent être exprimés simultanément dans une même cellule [155].

L'importance des intégrines a pu être décelée grâce à différents modèles de *knockout* murins. En effet, la suppression d'intégrines peut entraîner une variété d'effets néfastes, allant d'un défaut d'implantation endométriale à la létalité embryonnaire ou périnatale jusqu'à des défauts développementaux [155,156]. Chez l'humain, le syndrome de déficience d'adhérence leucocytaire (*leukocyte adhesion deficiency syndrome*, LAD) est causé par des mutations de la sous-unité $\beta 2$, ce qui altère les fonctions leucocytaires. Les patients en souffrant sont à risque de défauts de phagocytose et de chimiotaxie, de mauvaise guérison de plaies et d'infections graves [157]. Un polymorphisme de la sous-unité α_M augmente les risques d'avoir le lupus érythémateux disséminé [158]. Le risque de maladie inflammatoire de l'intestin, comme la maladie de Crohn ou la colite ulcéreuse, augmente avec l'expression amplifiée des allèles *Itgal*, codant pour la sous-

unité α_L (CD11a) [159]. Ainsi, les intégrines sont particulièrement importantes dans le système immunitaire.

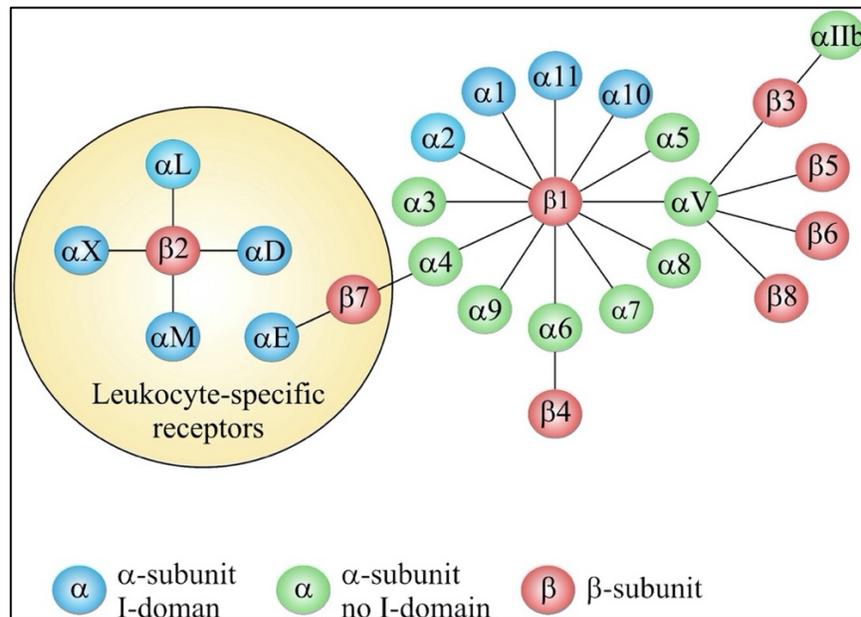


Figure 10. La superfamille des intégrines.

Les intégrines peuvent être subdivisées en fonction de leurs chaînes β . Certaines chaînes α peuvent se combiner à plusieurs chaînes β . Chez l'humain, il existe 24 intégrines différentes. (Adapté de Gahmberg et al., 2009) [155]

1.3.1. Intégrines β_2

Les leucocytes expriment diverses intégrines, dont β_1 ($\alpha_4\beta_1$), β_2 ($\alpha_L\beta_2$, $\alpha_M\beta_2$, $\alpha_X\beta_2$, $\alpha_D\beta_2$) et β_7 [$\alpha_4\beta_7$ et $\alpha_E\beta_7$] [160]. Les **intégrines β_2** prédominent sur les leucocytes [155]. Elles sont composées de la sous-unité β CD18 (intégrine bêta 2, *Itgb2*) qui peut s'associer aux sous-unités α suivantes : CD11a (intégrine alpha L, *Itgal*), CD11b (intégrine alpha M, *Itgam*), CD11c (intégrine alpha X, *Itgax*) et CD11d (intégrine alpha D, *Itgad*). L'abondance relative de ces intégrines varie en fonction du type cellulaire, de la différenciation et de l'état d'activation cellulaire (tableau 1). Plus précisément, les combinaisons différentes possibles sont : $\alpha_L\beta_2$ (intégrine LFA-1, CD11a/CD18), $\alpha_M\beta_2$ (CD11b/CD18, CR3), $\alpha_X\beta_2$ (CD11c/CD18, CR4) et $\alpha_D\beta_2$ (CD11d/CD18) [160].

Les intégrines existent essentiellement sous deux formes. La forme inactive est repliée sur elle-même et a une faible affinité pour son ligand. La forme active a une conformation plutôt étendue et une haute affinité pour son ligand [161]. Une réponse immunitaire adéquate implique l'adhésion et l'extravasation des cellules immunitaires dans les tissus et la circulation lymphatique. Pour permettre une telle réponse, les leucocytes doivent migrer efficacement. Cela est possible grâce au changement de la conformation de l'intégrine $\beta 2$. Normalement, l'intégrine $\beta 2$ est inactive [162]. Suite à un stimulus inflammatoire, deux voies de signalisation sont activées, soit celle de l'intérieur vers l'extérieur (*inside-out*) puis celle de l'extérieur vers l'intérieur (*outside-in*), changeant la conformation de l'intégrine $\beta 2$ et permettant ainsi l'adhésion et l'extravasation tissulaire. Plus précisément, la signalisation *inside-out* modifie la façon dont les cellules interagissent avec leur environnement en régulant l'affinité et l'avidité des récepteurs à leurs ligands de la MEC [163]. La signalisation *outside-in* implique l'activation de cascades de signalisation intracellulaires en réponse à la liaison de ces ligands à leurs récepteurs. Plus spécifiquement, suite à l'engagement de récepteurs de chimiokines ou les TLRs, des protéines comme la taline et la kindline lient le domaine intracellulaire de la sous-unité $\beta 2$. L'intégrine change sa conformation et se lie à son ligand avec une plus grande affinité. Cette liaison provoque une cascade de signalisation en aval qui change le cytosquelette d'actine cellulaire. Des complexes protéiques focaux sont formés et l'adhésion cellulaire devient possible (figure 11) [164].

Il existe de plus en plus d'évidences qui placent les intégrines $\beta 2$ au centre de l'équilibre entre l'activation et la suppression immunitaire. Par exemple, d'une part, elles favorisent le recrutement des monocytes et la rétention des macrophages tissulaires lors des contextes inflammatoires. D'autre part, elles permettent la formation d'une synapse immunitaire inhibitrice entre les cellules T et les DCs et atténuent les réponses des macrophages suite à la stimulation des TLRs [164].

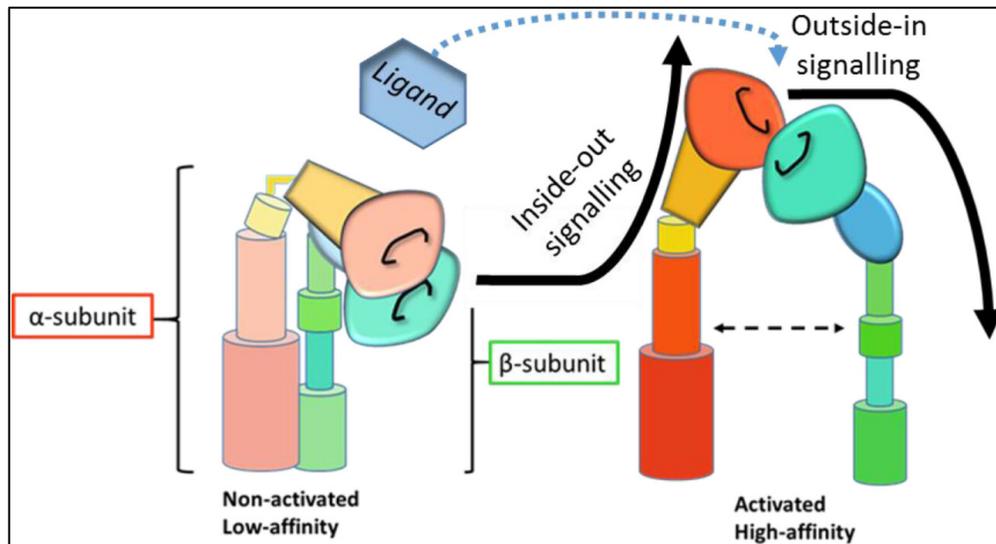


Figure 11. Représentation schématique de l'activation et de la signalisation de l'intégrine.

La signalisation de l'intérieur vers l'extérieur induit un changement de conformation de l'intégrine. Elle passe d'un état inactif à un état actif à haute affinité pour son ligand. Lors de la liaison du ligand, l'intégrine activée transmet des signaux de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule, déclenchant une cascade de signalisation en aval. (Adapté de Schittenhelm et al., 2017) [164]

Les intégrines $\beta 2$ sont importantes pour les cellules NK. Par exemple, l'intégrine LFA-1 permet une adhésion cellulaire stable, l'assemblage d'une synapse immunologique et la polarisation de granules lytiques [165,166]. En absence de cette synapse, la cellule NK ne peut pas relâcher ces granules et induire sa cytotoxicité de manière efficace. De plus, les sous-ensembles de cellules NK humaines les plus matures et cytotoxiques ont une expression plus importante LFA-1 [165]. Crozat et al. ont étudié l'effet de l'ablation des intégrines $\beta 2$ (spécifiquement CD11a-c/CD18) sur la fonction et le développement des cellules NK. Dans leur étude, il y avait une accumulation de cellules NK c-kit⁺ témoignant d'un défaut de maturation terminale. In vitro, les cellules NK avaient un plus faible potentiel de dégranulation et de sécrétion d'IFN- γ . In vivo, elles étaient hypofonctionnelles en présence de cellules de la lignée Yac, mais avaient une réponse précoce anti-virale préservée contre le MCMV [167].

Tableau 1. – Distribution et fonctions des principales intégrines leucocytaires

Noms des intégrines et leurs synonymes	Ligands	Expression cellulaire	Fonctions majeures
$\alpha_L\beta_2$ LFA-1 CD11a/CD18	ICAM-1-5, TLN, collagène de type I	Cellules B, cellules B, monocytes/macrophages, cellules NK, cellules dendritiques, neutrophiles, éosinophiles (tous les leucocytes)	Migration des cellules T, des monocytes, des neutrophiles et des éosinophiles. Activation et adhésion des cellules B, T, et dendritiques. Cytotoxicité des cellules CTL et NK [168–170]
$\alpha_M\beta_2$ Mac-1 CD11b/CD18 CR3 Mo1	ICAM-1, ICAM-2, ICAM-4, iC3b, fibrinogène, facteur X, héparine, laminine, LPS, zymosan, oligodésoxynucléotide, collagène, élastase	Cellules T $\gamma\delta$, monocytes/macrophages, neutrophiles, éosinophiles, cellules NK	Adhésion, activation et phagocytose des macrophages, des monocytes, des neutrophiles, des éosinophiles, des basophiles, des cellules dendritiques et NK [171,172]
$\alpha_X\beta_2$ CD18/CD11c CR4 p150/95	iC3b, fibrinogène, collagène, CD23 héparine, LPS, protéines dénaturées	Monocytes/macrophages, neutrophiles, cellules NK	Adhésion et phagocytose des monocytes/macrophages et neutrophiles, adhésion des cellules NK [172,173]
$\alpha_D\beta_2$ CD11d/CD18	ICAM-3, VCAM-1	Cellules T, macrophages, éosinophiles, cellules NK	Adhésion et migration des macrophages et des éosinophiles, adhésion des cellules T [174]

CR3, *complement receptor-3*; DC, *dendritic cell*; ICAM-1, *intercellular adhesion molecule-1*; iC3b, *inactivated-C3b*; LFA-1, *lymphocyte function-associated antigen-1*; LPS, *lipopolysaccharide*; Mac-1, *Macrophage-1 antigen*; TLN, *telencephalin*; VCAM-1, *vascular cell adhesion molecule-1*.

(Adapté de Zhang et al., 2012 et de Tan et al., 2012) [152,175]

1.3.1.1. Cellules pré-mNKs, sous-unité CD11d et intégrine CD11d/CD18

Tel que décrit précédemment (section Cellule pré-mNK murine), les cellules pré-mNK murines ont un grand potentiel anti-tumoral qui a été démontré dans plusieurs modèles expérimentaux. Par conséquent, le groupe de Lesage a évalué les facteurs régulant le nombre des cellules pré-mNKs avec l'idée que la modulation de leur nombre puisse être bénéfique dans le traitement du cancer [41]. Dans leur étude, la proportion de cellules pré-mNKs de la souris NOD (*nonobese diabetic*) est beaucoup plus faible que celle de la lignée B10.BR, suggérant que le nombre des pré-mNKs est lié à des facteurs génétiques. Des analyses d'étude de liaison génétique entre les lignées NOD.*H2k* et B10.BR ont démontré que le chromosome 7 régule le nombre des pré-mNKs chez la souris. La souris NOD.*H2k* est congénique pour le locus $H2^k$ du CMH. Le choix de cette souris dans leur étude est expliqué par le fait qu'elle ne développe pas de diabète auto-immun qui peut influencer le système immunitaire et donc potentiellement le nombre de cellules pré-mNKs.

En général, pour étudier les polymorphismes génétiques distinguant deux lignées murines, un premier croisement entre-elles peut être effectué pour générer une progéniture mixte F1. La descendance F1 peut être croisée pour générer une deuxième progéniture (F2) avec une mosaïque génétique. Les souris F2 peuvent être par la suite phénotypées et génotypées. Les données sont corrélées statistiquement pour identifier des loci génétiques associés à un phénotype d'intérêt [176]. Pour confirmer l'impact du chromosome 7, Guimont-Desrochers et al. ont analysé la souris congénique NOD.Lc7 qui contient les allèles du chromosome 7 de la souris C57BL/6 dont le nombre de pré-mNKs est normalement élevé [41]. Tel qu'attendu, les proportions de pré-mNKs dans la souris NOD.Lc7 était rétabli, confirmant que des allèles dans ce segment chromosomique influence la proportion des pré-mNKs dans la rate. Le même groupe a effectué un séquençage d'ARN des rates des souris NOD et NOD.Lc7 [177]. Leur analyse a démontré que, parmi les 400 gènes de l'intervalle Lc7, 40 gènes étaient différemment exprimés ou polymorphiques. En évaluant les gènes à la fois différemment exprimés et polymorphiques dans la région distale de cet intervalle (qui régule les proportions des pré-mNKs tel qu'établi préalablement), les gènes *Itgad* et *Cox6a2* étaient ressortis. Ces résultats positionnent *Itgad*,

codant pour la protéine CD11d, à titre de gène candidat dans la régulation de la proportion des cellules pré-mNKs.

CD11d est la sous-unité α la plus récemment découverte par Wong et al. en 1996. L'équipe avait démontré par approche génomique que, chez l'humain, CD11d est codé par le gène *Itgad* qui est hautement apparenté aux gènes codant pour CD11a (*Itgal*), CD11b (*Itgam*) et CD11c (*Itgax*) [178]. Le CD11d est sans doute le moins connu des sous-unités α en partie à cause de l'absence d'un anticorps humain commercialement disponible [164]. En plus de jouer un rôle dans la migration cellulaire en se liant aux ligands VCAM-1 et ICAM-3 au cours d'une réaction inflammatoire, l'intégrine CD11d/CD18 est impliquée dans l'activation des neutrophiles, des macrophages, des éosinophiles et dans la prolifération des LT [179–182]. Chez la souris, l'expression de CD11d est limitée. Wu et al. ont trouvé que seuls les splénocytes CD11b⁺ co-expriment CD11d, suggérant une interdépendance des intégrines [180]. Dans leur étude, des souris déficientes en CD11b ou CD11d avaient une plus faible immunité contre des entérotoxines staphylococciques associée à une altération phénotypique et proliférative des LT. Peu de littérature sur l'impact de CD11d sur les cellules NK existe par ailleurs. Dans l'expérience précédente, la cytotoxicité des cellules NK des souris CD11d-KO était préservée [180]. Chez l'homme, l'interaction entre les neutrophiles et les cellules NK est possible via la molécule d'adhésion intracellulaire ICAM-3 et CD11d/CD18 respectivement. Cette colocalisation permet l'activation des cellules NK par les neutrophiles et potentialise leur sécrétion d'IFN- γ [183].

La sous-unité CD11d est impliquée dans plusieurs processus pathologiques. En effet, l'expression d'*Itgad* chez les humains et les souris est augmentée dans la graisse blanche dans l'obésité, une condition caractérisée par une augmentation de l'inflammation systémique [184]. De plus, l'activation de CD11d peut augmenter l'expression de l'IL-1 β qui peut contribuer à une variété de maladies auto-immunes lorsque produite en grandes quantités [185]. Le blocage transitoire de l'intégrine CD11d/CD18 ou CD11d suite à un traumatisme de la moelle épinière chez le rat limite les dommages tissulaires et améliore les fonctions autonomes, sensorielles et motrices [181,186].

En conclusion, les intégrines jouent un rôle crucial dans le système immunitaire. Leur impact sur les cellules NK et les cellules pré-mNKs sont à clarifier. Une compréhension plus exhaustive de la

sous-unité CD11d et de l'intégrine CD11d/CD18 est nécessaire puisqu'ils peuvent avoir des impacts thérapeutiques.

1.4. Modèles murins en recherche

La souris est le modèle animalier le plus utilisé en recherche fondamentale dans le domaine de l'immunologie. Le modèle murin permet une meilleure compréhension des concepts fondamentaux et sert d'un outil expérimental pour des études translationnelles. Il est indéniable que les informations tirées d'études murines ont un impact sur notre compréhension de la santé humaine. Afin de pouvoir tirer des conclusions valides de ces études, il faut s'assurer que le modèle murin utilisé est adapté à la question abordée. Il existe plusieurs lignées permettant d'adresser des hypothèses scientifiques spécifiques [187].

1.4.1. Lignée C57BL/6

La lignée C57BL/6 (B6) est la souche murine la plus communément utilisée en recherche biomédicale. C'est la première souche dont le génome a été séquencé et publié. Sa popularité s'explique en partie par sa capacité de reproduction facile, son état physiquement actif et sain et sa capacité d'apprendre différentes tâches. Ainsi, les souris B6 sont souvent utilisées comme souris « contrôles » dans les expériences. Initialement développée pour l'étude du cancer et des réponses immunitaires, cette souche sert de modèle dans plusieurs autres contextes comme la nutrition, l'obésité et la signalisation cellulaire. De plus, il existe plusieurs sous-types de B6 avec des phénotypes différents offrant une flexibilité de choix pour les études murines. Des phénotypes de B6 avec des marqueurs alléliques différents, tel que B6.SJL (CD45.1). La différence des marqueurs alléliques permet d'utiliser ces souris simultanément dans une expérience de transfert adoptif et de distinguer les cellules d'une souris hôte (souris receveuse) de celles injectées (souris donneuse) en se fiant à leurs marqueurs alléliques respectifs. Les souris B6

peuvent être génétiquement modifiées en créant, entre autres, des souris congéniques ou des souris *knockout*. L'ablation d'un gène spécifique permet de mieux discerner son rôle biologique [188–190].

1.4.2. Lignée CD11d-KO

La souris CD11d-KO a le fond génétique de la souris B6 mais n'exprime pas le gène *Itgad* qui code pour la sous-unité alpha CD11d de l'intégrine CD11/CD18. Elle a été obtenue grâce à l'insertion d'un transgène (un vecteur) qui a interféré avec le gène *Itgad*. Pour générer une telle souris *knockout*, une nouvelle séquence d'ADN dotée d'un gène de résistance à la néomycine (*neomycin resistance gene*, NeoR gene) est introduite par électroporation dans des cellules souches embryonnaires isolées de blastocystes murins. Par le processus naturel de recombinaison homologue, certaines de ces cellules souches électroporées incorporent la nouvelle séquence à la place du gène d'intérêt. La néomycine est un antibiotique normalement toxique pour les cellules murines. Cependant, l'ajout du gène NeoR aux cellules leur confère une résistance à l'antibiotique lorsqu'elles sont en culture. Ainsi, seules les cellules souches exprimant le gène NeoR (et donc le *knockout*) survivent. Elles sont par la suite isolées et insérées dans des blastocystes murins qui sont implantés dans l'utérus d'une souris porteuse. Les nouveau-nés en résultants sont des chimères qui contiennent le matériel génétique des cellules souches originaires des blastocystes et des cellules souche du modèle *knockout*. Les chimères sont croisées avec d'autres souris pour générer des souris hétérozygotes pour le gène d'intérêt. Les souris hétérozygotes sont croisées entre elles pour générer des souris homozygotes qui n'expriment donc pas du tout le gène ciblé initialement [190]. La souris CD11d-KO a été générée en perturbant une région de 2,2 Kb contenant les exons 1 et 2 de la même manière que décrit ci-dessus. La séquence a été électroporée dans des cellules souches de type AB2.1 dérivées de la souche murine 129S7/SvEvBrd-Hprt^{b-m2}. Ces cellules ont par la suite été injectées dans des blastocystes de souris B6. Les chimères générées ainsi ont été croisées avec des souris B6, puis rétrocroisées pour 12 générations avant d'obtenir une lignée CD11d-KO [180]. Les souris CD11d-

KO utilisées dans les expériences dans le cadre ce mémoire ont été obtenues du laboratoire de Yakubenko du département de sciences biomédicales du Center of Excellence for Inflammation, Infectious Disease and Immunity du East Tennessee State University.

1.4.3. Lignée NOD

La souris NOD ou *nonobese diabetic* est un excellent modèle pour l'étude des maladies auto-immunes et est un outil important pour disséquer les mécanismes de tolérance immunitaire. Comme son nom l'indique, cette souche est à risque de développer le diabète auto-immun spontanément, partageant des similitudes avec le diabète de type I humain [191]. Le diabète est causé par une insulite, un état inflammatoire caractérisé par une infiltration leucocytaire des îlots pancréatiques [192]. La prédisposition au diabète est sous contrôle polygénique et environnemental. De multiples loci contrôlent la prédisposition génétique au diabète chez la souris NOD. En effet, elle héberge un haplotype unique du CMH appelé H2^{g7} ou *Idd1*. Celui-ci est retrouvé sur le chromosome 17 et il est le contributeur génétique le plus important à la prédisposition au diabète [191,193]. Outre le diabète, la souris NOD est à risque de développer d'autres maladies auto-immunes telles que les thyroïdites, les cardiomyopathies et les polyneuropathies périphériques [194]. Le système immunitaire de cette souris est également défectueux à plusieurs niveaux. Par exemple, elles n'expriment pas toutes les protéines du système du complément et ont des cellules T régulatrices, NKT, NK et des macrophages défectueux [191].

1.4.3.1. Cellules NK dans la lignée NOD

Comme la fonction des cellules NK est défectueuse dans cette lignée, elle représente un modèle adéquat pour comprendre les facteurs génétiques impliqués dans la biologie de ces cellules. La première indication d'un tel défaut était observée parmi les splénocytes avec une capacité in vitro réduite à tuer la lignée Yac-1 [195,196]. Un des mécanismes proposés est en lien avec le récepteur

d'activation NKG2D. Chez la souris NOD, bien que l'expression de NKG2D soit comparable à la souris B6, il y a une régulation positive inappropriée de Rae1 en contexte inflammatoire qui provoque sa liaison au NKG2D puis l'internalisation du récepteur, compromettant l'activité cytotoxique des cellules NK [197]. Il a déjà été proposé que les cellules NK chez la souris NOD contribuent possiblement au développement du diabète de type I [197–199] et qu'à l'inverse, le diabète contribue à la dysfonction systémique des cellules NK [200]. Johansson et al. ont démontré une dysfonction des récepteurs activateurs des cellules NK, FcR et Ly49D, chez les souris NOD. Collectivement, ces études suggèrent que plusieurs mécanismes sont défectueux dans les cellules NK de la lignée NOD. Par ailleurs, le locus *Idd6*, également impliqué dans la prédisposition de la souris NOD au diabète spontané [201], se retrouve sur le chromosome 6 chevauchant le complexe de gènes tueurs naturels (*natural killer gene complex*, NKC). Ce complexe contient des gènes qui codent pour les récepteurs activateurs et inhibiteurs des cellules NK murines comme de la famille Ly49 [202]. Le NKC des souris NOD est unique, car il code pour beaucoup plus de récepteurs activateurs et inhibiteurs de la famille Ly49 que les souris B6 [203]. Des polymorphismes au sein de ce complexe chez la souris NOD peuvent expliquer en partie les défauts de leurs cellules NK [204]. Par ailleurs, l'haplotype NKC des souris NOD porte un gène *Nkrpc1* inactif. Leurs cellules NK n'expriment donc pas l'épitope NK1.1, impliqué normalement dans leur réponse cytotoxique. De manière intéressante, la fonction des cellules NK des souris congéniques pour le NKC (NOD.NK1.1) ne sont que partiellement restaurées, suggérant que le défaut des cellules NK dans la lignée NOD n'est pas uniquement dû à leur NKC [199,205]. En concordance avec cette idée, l'équipe de Benoist ont montré que, contrairement aux souris B6, le gène de l'IL-15 sur le chromosome 8 est exprimé à de plus faibles niveaux dans la souris NOD. Cette cytokine est essentielle au développement et à l'activation des cellules NK (voir section Rôle des cytokines dans le développement des cellules NK). L'injection d'IL-15 complexée avec le récepteur IL15R α Fc dans les souris NOD améliore la cytotoxicité de leurs cellules NK [206]. Ainsi, ces résultats démontrent qu'une expression inadéquate du gène de l'IL-15 contribue en partie aux défauts fonctionnels des cellules NK de la souris NOD. Finalement, deux études récentes soulignant l'importance de la lignée NOD pour mieux comprendre les cellules NK ont été menées par le groupe Lesage [207,208]. D'abord, en utilisant des souris congéniques NOD, le groupe a

validé que le CMH et les loci du chromosome 9 influencent la proportion et le nombre absolu de cellules NK [208]. De plus, grâce à des analyses de liaison génétique sur le croisement des lignées B6.Rag1^{-/-} et NOD.Rag1^{-/-}, le suppresseur de tumeur p53 a été identifié comme élément clé dans la maturation fonctionnelle des cellules NK [207].

1.4.4. Lignées Rag^{-/-}.IL2rgc^{-/-} et NRG

La souris Rag^{-/-}.IL2rgc^{-/-} est obtenue par le croisement de la souris Rag1^{-/-} avec la souris IL2rg^{-/-}. La première souche (Rag1^{-/-}) a le bagage génétique d'une souris B6, mais contient une mutation du gène activant la recombinaison (*recombination-activating gene*, RAG). Cette mutation empêche la recombinaison des récepteurs des LB et des LT ainsi que la différenciation de ces cellules. La production et la fonction des cellules NK n'est par contre pas altérée. La deuxième souche (IL2rg^{-/-}) n'exprime pas la chaîne γ c des récepteurs de l'IL-2, l'IL-4, l'IL-7, l'IL-9, l'IL-15 et l'IL-21 qui sont importante au développement des LB, LT et des cellules NK. L'absence de signalisation à travers ces récepteurs entraîne des défauts majeurs de développement des cellules B et T et une absence totale de cellules NK. Ainsi, le croisement des souches Rag^{-/-} et IL2rg^{-/-} produit une lignée sévèrement immunosupprimée. Ces souris sont très utiles, entre autres, pour des expériences de xénogreffe (souris humanisées), de transplantation tumorale et de transfert adoptif, car elles sont dépourvues de cellules B, T et NK et permettent donc l'étude spécifique de populations cellulaires injectées. Les mutations mentionnées ci-dessus peuvent être présentes sur des souris avec un autre bagage génétique, comme c'est le cas des souris NRG avec le fond génétique de la souris NOD [209,210].

1.5. Hypothèses et objectifs de recherche

Les cellules NK sont dotées d'une fonction anti-tumorale. Afin d'optimiser cette fonction, d'améliorer et de mieux adapter les immunothérapies à base de cellules NK, il est important d'approfondir nos connaissances sur les facteurs régulant leur nombre et leur cytotoxicité. Le bagage génétique d'un individu régule très étroitement les caractéristiques des cellules NK et donc sa prédisposition au cancer. Les différences génétiques décelées entre deux lignées murines peuvent nous informer sur les mécanismes sous-jacents les variations fonctionnelles observées entre deux humains différents. Par ailleurs, les cellules NK de la lignée NOD présentent des défauts phénotypiques et fonctionnels. En outre, des données indiquent que les proportions des cellules pré-mNK, précurseurs des cellules NK, sont intimement liées au chromosome 7 dans lequel se trouve le gène *Itgad* dont le rôle sur les cellules immunitaires sont peu connues. Ainsi, pour faire suite à ces travaux, nous émettons les **hypothèses** suivantes :

1. Le gène *Itgad* est impliqué dans la régulation de la proportion et la fonction des cellules NK;
2. La diminution de l'activité globale des cellules NK chez les souris NOD par rapport aux souris B6 résulte d'une plus faible abondance de cellules NK efficaces pour chaque stade de la maturation fonctionnelle;

Pour répondre aux hypothèses, les **objectifs** de ce mémoire sont de :

1. Déterminer l'impact de l'ablation du gène *Itgad* sur la proportion et le phénotype des cellules NK;
2. Étudier l'effet de l'absence du gène *Itgad* sur la fonction in vitro et in vivo des cellules NK;
3. Caractériser les fonctions effectrices in vitro des cellules NK entre la lignée NOD et B6 pour chaque stade de la maturation fonctionnelle;
4. Comparer le potentiel anti-tumoral in vivo des différents stades des cellules NK de la lignée NOD et B6.

2. CHAPITRE 2 – LOSS OF CD11D CAUSES A DECREASE IN CD11B AND CD11C EXPRESSION WITH FUNCTIONAL CONSEQUENCES ON NK CELL ACCUMULATION IN TUMOURS

Maher Al Khaldi, Marion Dubuissez, Victor Mullins-Dansereau, Geneviève Chabot-Roy, Lise Coderre, Sylvie Lesage

Nous visons de publier cet article *Journal of Leukocyte Biology*. Le manuscrit a donc été préparé selon les lignes directrices du journal.

Cet article était mon projet de maîtrise principal. J'ai contribué à la rédaction du protocole d'éthique avec l'aide de Geneviève Chabot-Roy (assistante de recherche) et de la Dre Sylvie Lesage. Quelques données préliminaires ont été obtenues par Victor Mullins-Dansereau (ancien étudiant à la maîtrise au labo Lesage). J'ai également effectué toutes les manipulations techniques, dont certaines sous la supervision de la Dre Marion Dubuissez (post-doctorante). J'ai cumulé les données et les ai analysées également. J'ai monté les figures et rédigé le manuscrit qui a été corrigé par la Dre Lise Coderre (associée de recherche) et la Dre Sylvie Lesage. J'évalue ainsi ma participation à 90%.

Cet article est important pour ce mémoire puisqu'il permet de clarifier le rôle de la sous-unité CD11d de l'intégrine leucocytaire CD11d/CD18 sur le phénotype et la fonction in vitro des cellules NK. De plus, ce travail démontre que CD11d a des implications fonctionnelles sur l'accumulation des cellules NK intra-tumorales, une avenue de recherche qui mérite d'être investiguée davantage pour l'amélioration de traitements d'immunothérapie avec des cellules NK.

2.1. Title Page

Title: Loss of CD11d causes a decrease in CD11b and CD11c expression with functional consequence on NK cell accumulation in tumours

Running title: Loss of CD11d affects NK cells

Summary sentence: The deletion of CD11d results in immune cell type specific changes in CD11a, CD11b, CD11c and CD18 expression, with most noticeable differences NK cells; this results in a decrease in CD107a expression and an accumulation of NK cells in B16F10 tumours.

Maher Al Khaldi, Marion Dubuissez, Victor Mullins-Dansereau, Geneviève Chabot-Roy, Lise Coderre, Sylvie Lesage

2.2. **Abbreviations**

ICAM-3: Intercellular adhesion molecule 3; LFA-1: lymphocyte function-associated antigen-1;
MHC-I: major histocompatibility complex I; NeoR gene: neomycin resistance gene; PMA:
Phorbol-12-Myristate-13-Acetate; TAP: transporter associated with antigen processing.

2.3. Abstract

Integrins of the $\beta 2$ integrin family (CD11a/CD18, CD11b/CD18, CD11c/CD18 and CD11d/CD18) regulate cellular signaling and facilitate leukocyte-cell adhesion. *Itgad* encodes CD11d, the latest discovered alpha subunit. We evaluated the effect of CD11d deficiency on the expression of CD11a, CD11b, CD11c and CD18 expression in splenic T cells, B cells, monocytes, cDCs, pDCs and NK cells in comparison to C57BL/6J mice. The effect of CD11d deletion on the expression of the other integrin subunits is specific to the type of immune cell, with the most noticeable decrease in CD11b and CD11c expression in NK cells. This led us to investigate the functional outcome of the loss of CD11d expression in NK cells. Both the proportion and absolute number of splenic NK cells are comparable between B6 and CD11d-KO mice. Following in vitro activation, NK cells from both strains show similar levels of IFN- γ production and CD69 expression; however, CD107a degranulation was significantly decreased in NK cells from CD11d-KO mice, suggesting a defect in effector functions. To determine if the absence of CD11d affected the in vivo function of NK cells, we injected B16F10 cells in B6 and CD11d-KO mice. Although tumour growth was not affected, an increased proportion of NK cells was found in the tumor bed of CD11d-KO relative to B6 mice. Altogether, this study sheds light on the effect of CD11d on the expression of other integrin subunits in immune cells and highlights the potential role of *Itgad* in modulating intra-tumoural NK-cell accumulation.

2.4. Introduction

Integrins are heterodimers composed of an alpha and a beta subunit, are broadly distributed, and have various roles in the immune system. They are transmembrane receptors that bind to a variety of ligands such as fibronectin, collagens, vitronectin and laminins and facilitate leukocyte adhesion to the extracellular matrix of various tissues [1]. Integrin binding activates signaling pathways regulating several cellular aspects such as the reorganization of the intracellular cytoskeleton, the movement of new receptors to the cell membrane and even cell cycle [1]. Integrin suppression can lead to a variety of adverse effects, including defects in endometrial implantation, embryonic or perinatal lethality, and developmental defects [2,3]. In humans, leukocyte adhesion deficiency syndrome (LAD) is caused by mutations in CD18, which alters leukocyte function and can lead serious infections [4]. In mice, deletion of CD18 leads to impaired T cell proliferation [5].

CD18, also known as $\beta 2$ integrin, partners with four different alpha chains to compose CD11a/CD18, CD11b/CD18, CD11c/CD18 and CD11d/CD18 integrins, interchangeably termed CD18 integrins, leukointegrins or the $\beta 2$ integrin subfamily [6]. In mice, CD11a, CD11b, CD11c and CD11d are encoded in the distal region of chromosome 7 by integrin alpha L (*Itgal*), alpha M (*Itgam*), alpha X (*Itgax*) and alpha D (*Itgad*), respectively. CD18, *Itgb2*, is found on chromosome 10.

CD11d is the latest α subunit discovered in humans and initially described to be expressed on myelomonocytic cells, macrophages (foam cells), granulocytes and T cells [7,8]. Miyazaki et al. later showed that CD11d is enriched in human dendritic cells (DCs), macrophages and monocytes [9]. In mice, CD11d expression on circulating leukocytes is variable according to the cellular type. Wu et al. demonstrated that CD11d is predominantly expressed in CD11b⁺ splenocytes [10]. It is expressed on DCs, found at low levels on monocytes and at high levels on peritoneal macrophages [11]. In addition to playing a role in cell migration by binding to ligands such as VCAM-1 and ICAM-3 in inflammatory settings, the CD11d/CD18 integrin is involved in the activation of neutrophils, macrophages, eosinophils and T cell proliferation [10,12–14]. CD11d-KO mice exhibit phenotypically altered T cells with deficient response to staphylococcal enterotoxin stimulation

[10]. In humans, CD11d/CD18 binding to ICAM-3 has been documented in interactions between NK cells and neutrophils, potentiating NK cell IFN- γ production [15].

A more comprehensive understanding of the implications of integrins in the immune system could lead to potential therapeutic targets for various diseases. In the present study, we evaluated the role CD11d in a CD11d-KO murine model on the phenotype and the expression of integrin subunits (CD11a, CD11b, CD11c, CD18) of various immune cells. We noticed that effect of CD11d deletion on the expression of other integrin subunits are immune cell type specific. The most noticeable difference in CD11b and CD11c expression was in NK cells. In addition to changes in the level of integrins, loss of CD11d on NK cells resulted in a decrease in CD107a expression after activation, suggesting impaired NK-cell degranulation. Lastly, although B16F10 melanoma tumour growth was not affected by loss of CD11d expression, NK cells from the CD11d-KO background accumulated in the tumor bed in comparison to their B6 counterpart.

2.5. Methods

2.5.1. Mice

C57BL/6 (B6) mice were purchased from The Jackson Laboratory. CD11d-KO mice were kindly donated by Dr. Valentin Yakubenko (Department of Biomedical Sciences, Center of Excellence for Inflammation, Infectious Disease and Immunity, East Tennessee State University). All strains were maintained at the Maisonneuve-Rosemont Hospital animal house facility (Montreal, Canada). All mice used were aged between 6 and 12 weeks. No differences in phenotypes between male and female mice were noted. Data from both sexes were hence compiled together. The Maisonneuve-Rosemont Hospital ethics committee, overseen by the Canadian Council for Animal Protection, approved the experimental procedures.

2.5.2. Cell preparation and flow cytometry

Spleens were harvested from mice in an isotonic buffer solution. The murine spleens were minced with a sharp sterile blade, placed in a 40- μ m nylon cell strainer (BioBasic) and pressed with the plunger of a 1-ml syringe until mostly fibrous tissue remained. For experiments requiring DC staining, 2 ml of collagenase I (1 mg/ml) were injected into the spleen after which the minced spleen was incubated at 37°C for 15 min before being pressed with a plunger. A single cell suspension was then obtained. Erythrocytes were lysed with buffered ammonium chloride solution (NH₄Cl). Immune cells were resuspended in a PBS + FBS 2% solution and counted before antibody staining. Flow cytometry readings were performed on the BD LSRFortessa™ X-20 Flow Cytometer.

2.5.3. Antibodies (Abs)

All Abs were purchased from BioLegend, unless indicated otherwise. Samples were stained with combinations of the following Abs: Zombie Aqua (Fixable Viability Dye), CD3 ϵ -BV711 (clone 17A2), CD19-BV711 (clone 6D5), CD19-BV605 (clone 6D5), NKp46 (CD335)-BV421 (clone 29a1.4), NK1.1-APC (clone PK136), NK1.1-FITC (clone PK136), CD27-PerCP-Cy5.5 (clone LG.3A10), F4/80-PE (clone

BM8), I-A^b-APC (clone AF6-120.1), B220-AF700 (clone RA3-6B2), CD11a-FITC (clone M17/4), CD11b-APC/Cy7 (clone M1/70), CD11c-BV650 (clone N418), CD18-FITC (clone M18/2), CD69-PE (clone H1.2F3), IFN- γ -APC (clone XMG1.2), CD107a-FITC (clone 1D4B).

Dead cells were excluded using the Zombie Aqua fixable viability kit. T cells were identified as CD3 ϵ ⁺, B cells as CD19⁺, NK cells either as CD3 ϵ ⁻CD19⁻NKp46⁺ or CD3 ϵ ⁻CD19⁻NK1.1⁺, as specified. Functional maturation of NK cells was characterized by CD11b and CD27 expression. Monocytes were identified as CD3 ϵ ⁻CD19⁻F4/80⁺, conventional dendritic cells (cDCs) as CD3 ϵ ⁻CD19⁻I-A^b⁺ and plasmacytoid DCs (pDCs) as CD3 ϵ ⁻CD19⁻B220⁺mPDCA-1⁺. Immune cells from tumours were identified as CD45⁺. Integrin subunits were CD11a, CD11b, CD11c, and CD18.

2.5.4. In vitro NK cell activation using PMA and ionomycin

To quantify the cytotoxic effectors of NK cells, splenocytes were stimulated in a 96-well plate with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and ionomycin for 4 hours. One million total splenic cells were placed in a 96-well plate and deposited in corresponding wells. The cells were cultured in 200 μ l of complete RPMI medium (ATCC) (10% SVF, 1% penicillin/streptomycin, 1% β -mercaptoethanol and 0.1% HEPES) in the presence of 5 μ g/ml brefeldin A (BFA) with or without 5 μ g/ml PMA and 250 ng/ml ionomycin. For the NK degranulation assay, 2 μ l of CD107a-FITC Ab was added to 2 ml of complete RPMI containing GolgiStop[™] protein transport inhibitor (BD Biosciences). The cells were subsequently incubated at 37°C, 5% CO₂, for 4 hours. Following incubation, the cells were washed and stained for surface and intracellular markers.

2.5.5. Surface and intracellular staining of NK cell cytotoxic effectors

For surface staining, 1x10⁶ cells or less were deposited in individual wells of a 96-well plate. The Abs listed above were deposited in control wells for single staining and corresponding wells at a concentration previously determined by titration. The cells were then incubated at 4°C for 30 minutes. They were then washed with isotonic buffer and resuspended in isotonic buffer for data acquisition with flow cytometry. Following surface staining, the cells were resuspended in 100 μ l of the fixation/permeabilization solution (Kit Cytofix/Cytoperm, BD Biosciences) and were

incubated at 4°C for 30 minutes. After cell fixation and permeabilization, the BD Perm/Wash™ Buffer was used to wash the cells and to dilute the anti-cytokine antibodies for staining in corresponding wells. The cells were again incubated for 30 minutes at 4°C. Following this last incubation, the cells were rinsed twice with the buffer solution, then resuspended in 100-150 µl of isotonic buffer, ready for flow cytometry. All samples were acquired by an LSRII or a Fortessa x-20 (BD Biosciences) then analyzed using FlowJo software (Tree Star).

2.5.6. Total RNA extraction

Cells were homogenized by adding 1 ml of TRIzol® Reagent (Invitrogen) to 5-10 x 10⁶ cells followed by vortexing. After 5 minutes incubation at room temperature (RT, 25°C), 0.2 ml of chloroform was added, followed by a 15-second vigorous shake of samples and reincubation at RT for 2-3 minutes. Samples were centrifuged at 12000 g for 15 minutes at 4°C. The aqueous phase was transferred to a fresh tube and RNA precipitating was done by adding 0.5 ml of isopropyl alcohol. Samples were incubated at RT for 10 minutes then centrifuged at 12000 g for x 10 minutes at 4°C. The supernatant was then removed, and the pellet was washed with 1 ml of 75% ethanol. Samples were mixed by vortexing and then centrifuged at 7400 g for 5 minutes at 4°C. Pellets were air-dried on the bench for 20 minutes then dissolved in 32µl of RNase-free water and incubating at 10 minutes at 55-60°C. RNA was stored at -80°C until further use. RNA purity was measured using the Tecan's Spark® multimode microplate reader. Samples with a 260/280 ratio value of ≤1.8 for RNA were excluded due to possible contamination.

2.5.7. qPCR

DNA was enzymatically digested from the previously extracted total RNA using the DNase I, Amplification Grade kit (Invitrogen) then was reverse-transcribed to cDNA by iScript Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR (Bio-Rad Laboratories) using oligo (dT) primers. Real-time PCR was performed with iTaq Universal SYBR Green Supremix (Bio-Rad Laboratories) on an Applied Biosystems™ 7500 Real-Time PCR System. Primer sequences were designed with PyroMark® Assay Design (Table 1).

2.5.8. Tumour cell line maintenance and injection, tumour measurement and preparation

B6F10 (B16) cell line was purchased from ATCC. B16 melanoma cells were cultured in complete DMEM medium (DMEM supplemented with 5% FBS, 1% penicillin/streptomycin, 1% HEPES, 0.1% β -mercaptoethanol) on an adherent surface (Sarstedt) and maintained at 37°C in an incubator with 5% CO₂. Periodic cellular passing was performed when reaching 70-90% cellular confluence. When ready for use, B16 cells were enzymatically dissociated with trypsin, washed, resuspended in phosphate-buffered saline (PBS) and counted. Under general anesthesia (isoflurane 2.5%, oxygen 2%), left flanks of B6 and CD11d-KO mice were shaved and injected subcutaneously with 2×10^5 melanoma cells.

Tumours were measured 3 times per week with a caliper (width, length) until mice were sacrificed. Tumour volume was estimated with the following formula: $(\text{length} \times \text{width}^2)/2$. The mice were followed up for a period of two weeks after which they were sacrificed, and their tumours and spleens were harvested. Tumours were cut into small pieces and digested with 25 mg/mL of collagenase D (Sigma-Aldrich) supplemented with 100 μ l of DNase I at a concentration of 1 mg/mL (Sigma-Aldrich) at 37°C for 15 minutes. Erythrocytes were lysed with NH₄Cl. Single-cell suspensions from spleens were prepared following the method described above.

2.5.9. Statistical analyses

P values were calculated using unpaired two-tailed Student's t-test for normal distribution or Mann-Whitney U test otherwise. A paired two-tailed t-test was performed for CD107a measures.

GraphPad Prism software version 8 was used for statistical and graphical analyses. Significance was accepted at *P* values <0.05 (**P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001).

2.6. Results

2.6.1. Characterization of the CD11d-KO model in the spleen

Itgal, *Itgam*, *Itgax* and *Itgad* genes, respectively encoding for CD11a, b, c and d, are located on the same region of mouse chromosome 7. We thus wanted to determine whether the loss of CD11d expression in the CD11d-KO was specific to CD11d, or if it also influenced the mRNA expression of surrounding genes. As such, we quantified the mRNA expression levels of CD11a, CD11b, CD11c and CD11d, as well as of CD18, the $\beta 2$ protein binding partner of the CD11 α subunits, which is encoded on a distinct chromosome, in the spleen of B6 and CD11d-KO mice. As expected, CD11d expression is undetected in the spleen from CD11d-KO mice (Fig. 1A). In contrast, the other integrin subunits are expressed at similar levels in the spleens of B6 and CD11d-KO mice (Fig. 1A). The deletion of the CD11d gene therefore does not significantly affect the transcription of other integrin subunits. To determine if protein levels were affected, we next measured the relative fluorescence intensity of splenic CD11a, CD11b, CD11c and CD18 subunits by flow cytometry. We could not test the expression of CD11d, as antibodies to CD11d are not commercially available. We surprisingly found that CD11c expression is significantly reduced in the spleen of CD11d-KO mice ($P = 0.02$) (Fig. 1B). Thus, the absence of CD11d impacts the expression of CD11c at a posttranscriptional level but does not alter the expression of the other $\beta 2$ family integrins in the spleen.

2.6.2. CD11d deletion alters integrin subunit expression in immune cells and most noticeably in NK cells

CD11c is highly expressed on DCs, and expressed at low levels on various immune cells. The decrease in CD11c expression in the spleen of CD11d-KO mice could thus potentially be explained by a reduction in the proportion and number of DCs. To address this, we compared the proportions and absolute numbers of immune cells in B6 and CD11d-KO mice. Neither the

proportions nor the absolute numbers of T cells, B cells, NK cells, monocytes, cDCs, and pDCs were altered between both murine lineages (Fig. 2, gating strategies on Fig. S2).

Integrins of the $\beta 2$ family are expressed at various levels on immune cells [1,16]. The decrease CD11c expression levels in the spleen of CD11d-KO mice could be due to a slight decrease in the expression levels of CD11c on all CD11c-expressing cells. As such, we quantified the protein expression levels of the CD11a, CD11b, CD11c and CD18 subunits in an immune cell type specific manner, namely in T cells, B cells, monocytes, cDCs, plasmacytoid dendritic cells (pDCs) and NK cells in B6 and CD11d-KO mice. When comparing immune cells from B6 and CD11d-KO mice, we find some modest variations (increases and decreases) in the level of expression of CD11a, CD11b, and CD18 in T cells, B cells, monocytes and cDCs, representing changes in less than 25% of the protein expression levels (Fig. 3A, B, D, E). In contrast, CD11c expression was more globally affected, resulting in a 28% decrease in T cells (Fig. 3A), 79% in NK cells (Fig. 3C, Fig. S3), 37% in cDCs (Fig. 3E.) and 77% in pDCs (Fig. 3F) in CD11d-KO mice when comparing to B6 mice. This result is in line with the decrease in Figure 1B. Of interest, in addition to CD11c, CD11b expression was significantly downregulated by 76% in NK cells from CD11d-KO mice in comparison to B6 mice (Fig. 3C, Fig. S3). Altogether, these results demonstrate that the effect of CD11d deletion on the expression of other integrin subunits are specific to the type of immune cell, with the most noticeable difference in CD11b and CD11c expression in NK cells.

Because the absence of CD11d had a most prominent impact on the expression of other integrins in NK cells, we shifted our attention toward this population. NK cells undergo four stages of functional maturation where they gradually acquire effector functions, thus accounting for a heterogeneous population of mNK cells in murine spleens and in circulation characterized by the differential expression of CD11b and CD27 [17]. While NK cells from B6 mice show a typical functional maturation profile with variegated expression of CD27 and CD11b, concordant with the diminished expression of CD11b in the KO mice, there was an almost complete absence of CD11b expression in NK cells from CD11d-KO mice (Fig. 4). This precluded the analysis of phenotypic functional maturation of NK cells from CD11d-KO mice.

2.6.3. CD11d-KO NK cells have decreased CD107a expression

Beyond modulating the expression of CD11b and CD11c on NK cells, we wanted to determine whether the absence of CD11d affected NK cell activation and function. Activated NK cells produce IFN- γ , express the activation marker CD69, and perform degranulation which can be quantified by CD107a expression. Therefore, we compared the expression levels of IFN- γ , CD69 and CD107a in spleen cells from B6 and CD11d-KO stimulated in vitro with PMA and ionomycin. The level of expression of IFN- γ and CD69 by NK cells was similar between both murine lines (Fig. 5A). CD107a was, however, significantly decreased in NK cells of the CD11d-KO strain in comparison to B6 (Fig. 5B). Together, these data show that, although NK cell activation is not globally impaired in CD11d-KO mice, loss of CD11d affects NK-cell degranulation, which could possibly indicate altered cytolytic activity.

2.6.4. B16-infiltrating NK cells from the CD11d-KO mice are present at higher proportions than in WT mice

To determine if the in vivo NK cell functions are altered by the loss of CD11d, we turned to an in vivo tumour model. Two weeks following B16 cell-injection, the average size of tumours between both lineages was equivalent (Fig. 6A), suggesting that the anti-tumour activity of immune cells in CD11d-KO mice is not impaired. In line with this observation, proportions of lymphocyte (CD45⁺ cells) in the tumour were similar in both mouse strains (Fig. 6B). A more detailed analysis of the tumour infiltrating lymphocytes showed a greater accumulation of NK cells in the tumour of CD11d-KO mice (Fig. 6D). Conversely, while splenic NK cell proportions are similar at steady state between both mouse strains (Fig. 2E), in tumour bearing mice, the proportions splenic NK cells were decreased in the CD11d-KO relative to their B6 counterpart (Fig. 6C). Thus, the CD11d-deficiency appears to facilitate the accumulation of NK cells in the tumor bed.

2.7. Discussion

In the present study, we investigated the impact of CD11d deficiency on the co-expression of CD11a, CD11b, CD11c and CD18 on immune cells. Our results show that the absence of CD11d strongly affects the expression of CD11b and CD11c on NK cells. Because of the decrease in CD11b expression, it was not possible to determine if the absence of CD11d influenced the phenotypic functional differentiation of NK cells. Regardless, we found that NK cells from CD11d-KO mice have decreased degranulation *in vitro*, suggesting that loss of CD11d may impair the cytotoxic activity of NK cells. In line with this observation, although NK cells were more abundant in tumours from CD11d-KO mice relative to B6 mice, B16 tumour growth was comparable in both strains. This suggests that NK cell function in CD11d-KO mice is impaired, being unable to limit tumour growth even when present in greater numbers. One possibility is that the decrease in CD107a expression in NK cells of the CD11d-KO background resulted in less efficient tumour cell killing *in vivo*.

The CD11/CD18 integrins of the $\beta 2$ family play an important role in modulating leukocyte functions [18], such as in cellular adhesion and in intracellular signaling in both normal and pathological conditions [5,6,19]. CD11d is the latest discovered alpha subunit of the family and is involved in several pathological processes. For instance, the expression of *Itgad* in humans and mice is increased in white adipose tissue in obesity, a condition characterized by an increase in systemic inflammation [20]. In addition, transient blockade of CD11d/CD18 or CD11d integrin following spinal cord injury in rats limits tissue damage and improves autonomic, sensory and motor functions [13,21].

Due to the scarce data on the role of *Itgad* on immune cells [10,15,22], we investigated the role of this gene on T cells, B cells, NK cells, monocytes, cDCs and pDCs. After having established that the absence of CD11d does not affect splenic proportions and absolute numbers of those immune cells, we determined that the effect of CD11d deletion on the expression of other integrin subunits of the $\beta 2$ family is cell specific. We observed an important decrease in CD11b and CD11c expression on NK cells from CD11d-KO mice, suggesting that integrin expression could be

regulated in a co-dependent manner [10]. Specifically, it appears that the expression of one integrin subunit could influence that of another subunit in a cell-type specific manner. Indeed, while loss of CD11d significantly affected CD11b and CD11c expression in NK cells, it barely influenced the expression in other lymphoid cells, such as T cells and B cells. The cell type specific mechanism influencing the expression of integrins of the $\beta 2$ family remains to be defined.

Data on the role of CD11d in NK cell biology is scarce [10,15,22]. Given that the most important decrease of CD11b and CD11c expressions were noted in these cells, we looked at the implication of CD11d in the functional potential of NK cells. IFN- γ and CD69 expression were similar between both lineages, suggesting similar in vitro IFN- γ production and activation potential despite the absence of CD11d and to a lesser extent CD11b and CD11c. These results are not surprising, as Crozat et al. have previously demonstrated that IFN- γ production, alongside IL-12p70 and IL-12p40, were not affected in murine splenic NK cells lacking $\beta 2$ integrins (Itgb2^{Jkr/Jkr} model on the B6 background) in the context of early MCMV infection [22]. In another study, CD11d/CD18 integrin on NK cells has been shown to interact with ICAM-3 on neutrophils in vitro, thus potentiating the production of IFN- γ [15]. In our case however, NK cells were stimulated with PMA and ionomycin in vitro. Under these conditions, where signaling through membrane receptors is bypassed, IFN- γ levels were preserved in the CD11d KO. This suggests that despite the fact that neutrophils directly function as NK-cell activators through the CD11d/CD18-ICAM-3 axis, IFN- γ production from NK cells does not solely depend on this interaction and could be bypassed in vitro [21]. The result of this stimulation may differ from a more physiological stimulus involving neutrophil-NK interaction.

In contrast, CD107a expression was significantly reduced in NK cells lacking CD11d expression, suggesting a decreased degranulation potential of CD11d-KO NK cells. Direct killing of cells by CD8⁺ T cells and NK cells occurs through a similar mechanism implicating an immune synapse formation. Integrin-mediated adhesion to target cells is required to form a synapse, followed by cellular cytoskeleton change facilitating polarization of cytolytic granules towards the synapse and then by degranulation which occurs by the fusion of the granules with the plasma membrane [23]. At first contact, adhesion molecules such as CD11a/CD18, CD2 and CD11b allow close binding of the NK cell to its target [24]. The downregulation of CD11b on NK cells could decrease

synapse formation. Whether there is a direct role for CD11d in the formation of an immune synapse has yet to be determined. As our assay was performed *in vitro* in the absence of cellular targets, the decrease in CD107a in CD11d-deficient NK cells is more likely due to an impact on the cytoskeleton. Moreover, although CD107a expression is significantly decreased, granzyme B and perforin expression must be measured, and direct *in vitro* and *in vivo* cytotoxicity assays must be performed to assess the cytotoxic potential of NK cells from the CD11d-KO background. Of note, no difference was found in NK-cell cytotoxicity directed against the YAC mouse lymphoma cell line in CD11d-KO mice in a previous study conducted by Huaizhu et al. [10], suggesting that direct *in vitro* cytotoxicity is not significantly altered in the absence of CD11d.

Our data show that tumour volumes did not differ between CD11d-KO and B6 mice. Interestingly however, tumour-infiltrating NK cells were present at greater proportion in tumours from the CD11d-KO lineage. This result was unexpected, as we initially assumed that a decrease in the expression of integrins would impair immune cell entry. For instance, CD11a^{-/-} mice failed to induce peritumoral inflammation, lymphocytic infiltration and tumour clearance in a MC57 murine fibrosarcoma model [25]. The increase in NK cell number in the tumour bed of CD11d-KO mice may alternatively be explained by decreased NK-cell death, increased intra-tumoural proliferation, an increased influx or a decreased efflux of cells from the tumour. Integrins have the capacity to bind to many ligands [26]. It is possible that CD11d/CD18 disruption led to a different ligand-binding repertoire favouring NK-cell migration from the spleen and circulation and into the tumour. Yakubenko et al. have demonstrated that an increased number of macrophages was present in inflamed murine peritoneum after blocking $\alpha\text{D}\beta\text{2}$ integrin (CD11d/CD18). [27]. Several other studies performed on macrophages demonstrate that the expression of CD11a-b-c alpha subunits differ from that of CD11d at a transcriptional level and with regards to cellular migration and tissue-adhesion. This suggests that CD11d/CD18 integrin could differ in mediating leukocyte migration and response in contexts of acute inflammation [7,27–29]. We could not conclude on the effect of CD11d on NK-cell function *in vivo* because T cells also participated in clearing B16 cells.

In conclusion, CD11d, encoded by *Itgad*, is the latest discovered alpha subunit of the $\beta 2$ integrin family. We studied the implications of studying CD11d-KO mice. The loss of CD11d expression does not affect the proportion and absolute numbers of immune cells, namely T cells, B cells, NK cells, monocytes, cDCs, and pDCs, yet it affected the expression of CD11a, CD11b, CD11c and CD18 integrin subunits in a cell type specific manner. CD11b and CD11c were most strongly decreased in NK cells from CD11d-KO mice, which also presented a decrease in the CD107a degranulation marker upon in vitro stimulation. In vivo, CD11d-KO NK cells were present at higher proportions in tumours compared to B6 NK cells. A more comprehensive understanding of the CD11d subunit and CD11d/CD18 integrin in NK cells is warranted and could potentially have therapeutic implications in cancer treatment.

2.8. Authorship

MAK conceptualised and performed experiments, analyzed data, created figures and wrote the original manuscript. MD offered technical support and helped in performing experiments. VMD performed experiments. GCR established flow experiments and supervised several experiments. LC reviewed and edited the paper. SL conceptualized the project, reviewed and edited the manuscript.

2.9. Acknowledgments

This work was supported by research funds from the Cancer Research Society to S.L. (20379, 23188) and the Canadian Institutes of Health Research (PJT152952). S.L. is a Research Scholars Emeritus awardee from the Fonds de la recherche en santé du Québec. We would like to thank the animal house staff for curating the colonies, Martine Dupuis for expert advice on flow cytometry, and Dr. Valentin Yakubenko for generously providing the CD11d-KO mice.

2.10. Conflict of Interest/Disclosure

The authors declare no conflict of interest.

2.11. References

1. Zhang Y, Wang H. Integrin signalling and function in immune cells. *Immunology*. 2012;135(4):268–75.
2. Yang JT, Rayburn H, Hynes RO. Embryonic mesodermal defects in alpha 5 integrin-deficient mice. *Dev Camb Engl*. 1993;119(4):1093–105.
3. Gahmberg CG, Fagerholm SC, Nurmi SM, Chavakis T, Marchesan S, Grönholm M. Regulation of integrin activity and signalling. *Biochimica Et Biophysica Acta Bba - Gen Subj*. 2009;1790(6):431–44.
4. Arnaout MA. Leukocyte Adhesion Molecules Deficiency: Its Structural Basis, Pathophysiology and Implications for Modulating the Inflammatory Response. *Immunol Rev*. 1990;114(1):145–80.
5. Scharffetter-Kochanek K, Lu H, Norman K, Nood N van, Munoz F, Grabbe S, et al. Spontaneous Skin Ulceration and Defective T Cell Function in CD18 Null Mice. *J Exp Med*. 1998;188(1):119–31.
6. Hynes RO. Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*. 1992;69(1):11–25.
7. Vieren MV der, Trong HL, Wood CL, Moore PF, John TSt, Staunton DE, et al. A novel leukointegrin, $\alpha\beta 2$, binds preferentially to ICAM-3. *Immunity*. 1995;3(6):683–90.
8. Wong DA, Davis EM, LeBeau M, Springer TA. Cloning and chromosomal localization of a novel gene-encoding a human $\beta 2$ -integrin α subunit. *Gene*. 1996;171(2):291–4.
9. Miyazaki Y, Vieira-de-Abreu A, Harris ES, Shah AM, Weyrich AS, Castro-Faria-Neto HC, et al. Integrin $\alpha\beta 2$ (CD11d/CD18) Is Expressed by Human Circulating and Tissue Myeloid Leukocytes and Mediates Inflammatory Signaling. *Plos One*. 2014;9(11):e112770.

10. Wu H, Rodgers JR, Perrard X-YD, Perrard JL, Prince JE, Abe Y, et al. Deficiency of CD11b or CD11d Results in Reduced Staphylococcal Enterotoxin-Induced T Cell Response and T Cell Phenotypic Changes. *J Immunol.* 2004;173(1):297–306.
11. Schittenhelm L, Hilkens CM, Morrison VL. β 2 Integrins As Regulators of Dendritic Cell, Monocyte, and Macrophage Function. *Front Immunol.* 2017;8:1866.
12. Mabon PJ, Weaver LC, Dekaban GA. Inhibition of Monocyte/Macrophage Migration to a Spinal Cord Injury Site by an Antibody to the Integrin α D: A Potential New Anti-inflammatory Treatment. *Exp Neurol.* 2000;166(1):52–64.
13. Bao F, Chen Y, Dekaban GA, Weaver LC. An anti-CD11d integrin antibody reduces cyclooxygenase-2 expression and protein and DNA oxidation after spinal cord injury in rats. *J Neurochem.* 2004;90(5):1194–204.
14. Grayson MH, Vieren MV der, Sterbinsky SA, Gallatin WM, Hoffman PA, Staunton DE, et al. α β 2 Integrin Is Expressed on Human Eosinophils and Functions as an Alternative Ligand for Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1). *J Exp Med.* 1998;188(11):2187–91.
15. Costantini C, Micheletti A, Calzetti F, Perbellini O, Tamassia N, Albanesi C, et al. On the potential involvement of CD11d in co-stimulating the production of interferon- γ by natural killer cells upon interaction with neutrophils via intercellular adhesion molecule-3. *Haematologica.* 2011;96(10):1543–7.
16. Tan S-M. The leucocyte β 2 (CD18) integrins: the structure, functional regulation and signalling properties. *Bioscience Rep.* 2012;32(3):241–69.
17. Chiossone L, Chaix J, Fuseri N, Roth C, Vivier E, Walzer T. Maturation of mouse NK cells is a 4-stage developmental program. *Blood.* 2009;113(22):5488–96.
18. Evans R, Patzak I, Svensson L, Filippo KD, Jones K, McDowall A, et al. Integrins in immunity. *J Cell Sci.* 2009;122(2):215–25.

19. Lu H, Smith CW, Perrard J, Bullard D, Tang L, Shappell SB, et al. LFA-1 is sufficient in mediating neutrophil emigration in Mac-1-deficient mice. *J Clin Invest.* 1997;99(6):1340–50.
20. Thomas AP, Dunn TN, Oort PJ, Grino M, Adams SH. Inflammatory Phenotyping Identifies CD11d as a Gene Markedly Induced in White Adipose Tissue in Obese Rodents and Women. *J Nutrition.* 2011;141(6):1172–80.
21. Gris D, Marsh DR, Oatway MA, Chen Y, Hamilton EF, Dekaban GA, et al. Transient Blockade of the CD11d/CD18 Integrin Reduces Secondary Damage after Spinal Cord Injury, Improving Sensory, Autonomic, and Motor Function. *J Neurosci.* 2004;24(16):4043–51.
22. Crozat K, Eidenschenk C, Jaeger BN, Krebs P, Guia S, Beutler B, et al. Impact of β 2 integrin deficiency on mouse natural killer cell development and function. *Blood.* 2011;117(10):2874–82.
23. Liu D, Bryceson YT, Meckel T, Vasiliver-Shamis G, Dustin ML, Long EO. Integrin-Dependent Organization and Bidirectional Vesicular Traffic at Cytotoxic Immune Synapses. *Immunity.* 2009;31(1):99–109.
24. Orange JS, Harris KE, Andzelm MM, Valter MM, Geha RS, Strominger JL. The mature activating natural killer cell immunologic synapse is formed in distinct stages. *Proc National Acad Sci.* 2003;100(24):14151–6.
25. Schmits R, Kündig TM, Baker DM, Shumaker G, Simard JJ, Duncan G, et al. LFA-1-deficient mice show normal CTL responses to virus but fail to reject immunogenic tumor. *J Exp Medicine.* 1996;183(4):1415–26.
26. Humphries JD, Byron A, Humphries MJ. Integrin ligands at a glance. *J Cell Sci.* 2006;119(19):3901–3.
27. Yakubenko VP, Belevych N, Mishchuk D, Schurin A, Lam SC-T, Ugarova TP. The role of integrin α D β 2 (CD11d/CD18) in monocyte/macrophage migration. *Exp Cell Res.* 2008;314(14):2569–78.

28. Yakubenko VP, Yadav SP, Ugarova TP. Integrin α D β 2, an adhesion receptor up-regulated on macrophage foam cells, exhibits multiligand-binding properties. *Blood*. 2006;107(4):1643–50.

29. Noti JD. Expression of the myeloid-specific leukocyte integrin gene CD11d during macrophage foam cell differentiation and exposure to lipoproteins. *Int J Mol Med*. 2002;10(6):721–7.

2.12. Figures

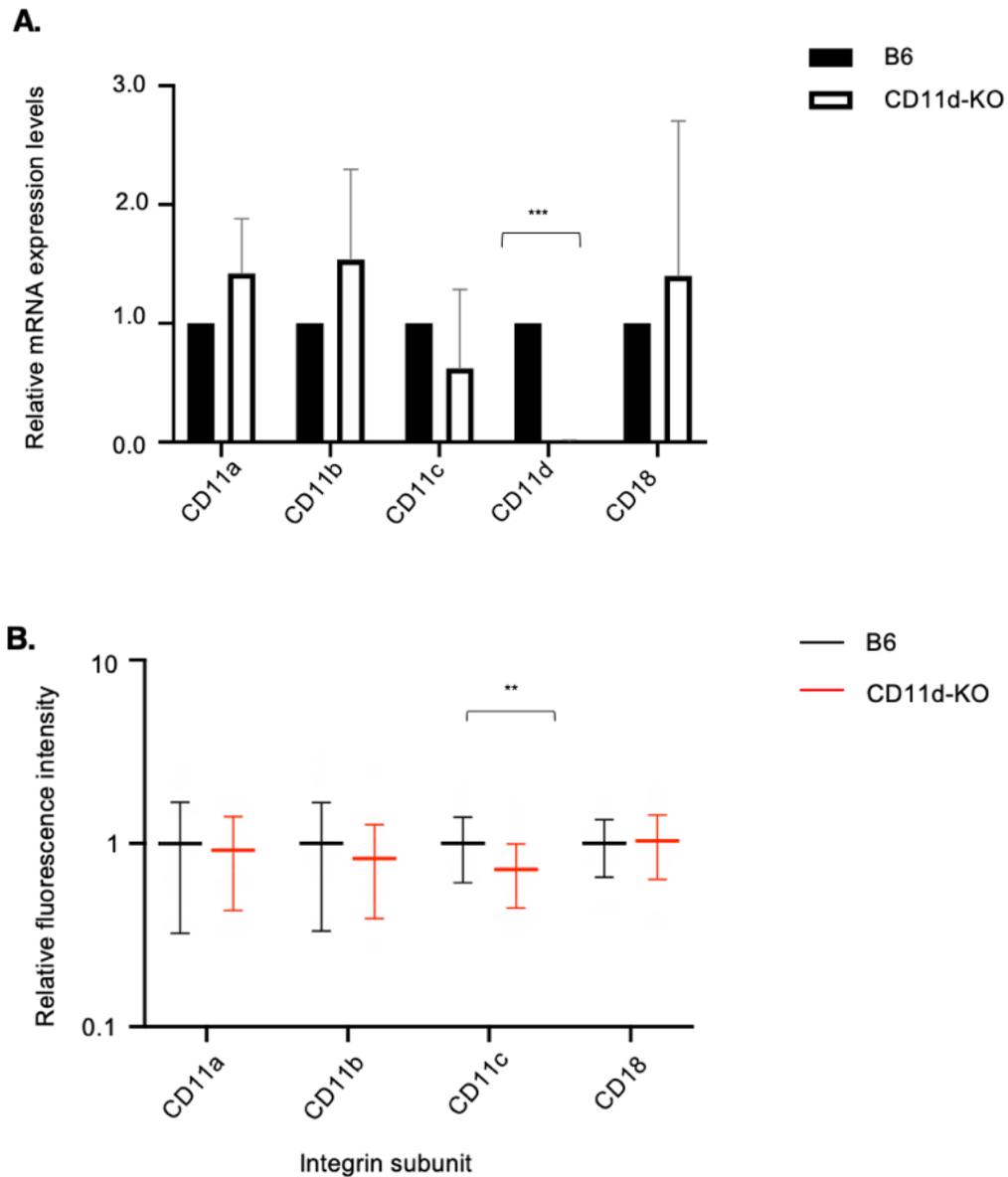


Figure 1. CD11d expression is specifically affected in the spleen of CD11d-KO mice. A. Expression of CD11a, b, c, d and CD18 by qPCR on total spleen cells from B6 and CD11d-KO mice. The graph shows mean \pm SD. $n \geq 3$, B. Relative fluorescence intensity of the integrin subunits of the $\beta 2$ integrin family measured by flow cytometry in a total spleen cells from B6 and CD11d-KO mice. The graph shows mean \pm SD. $n = 25$, ** P value < 0.01 , *** P value < 0.001 .

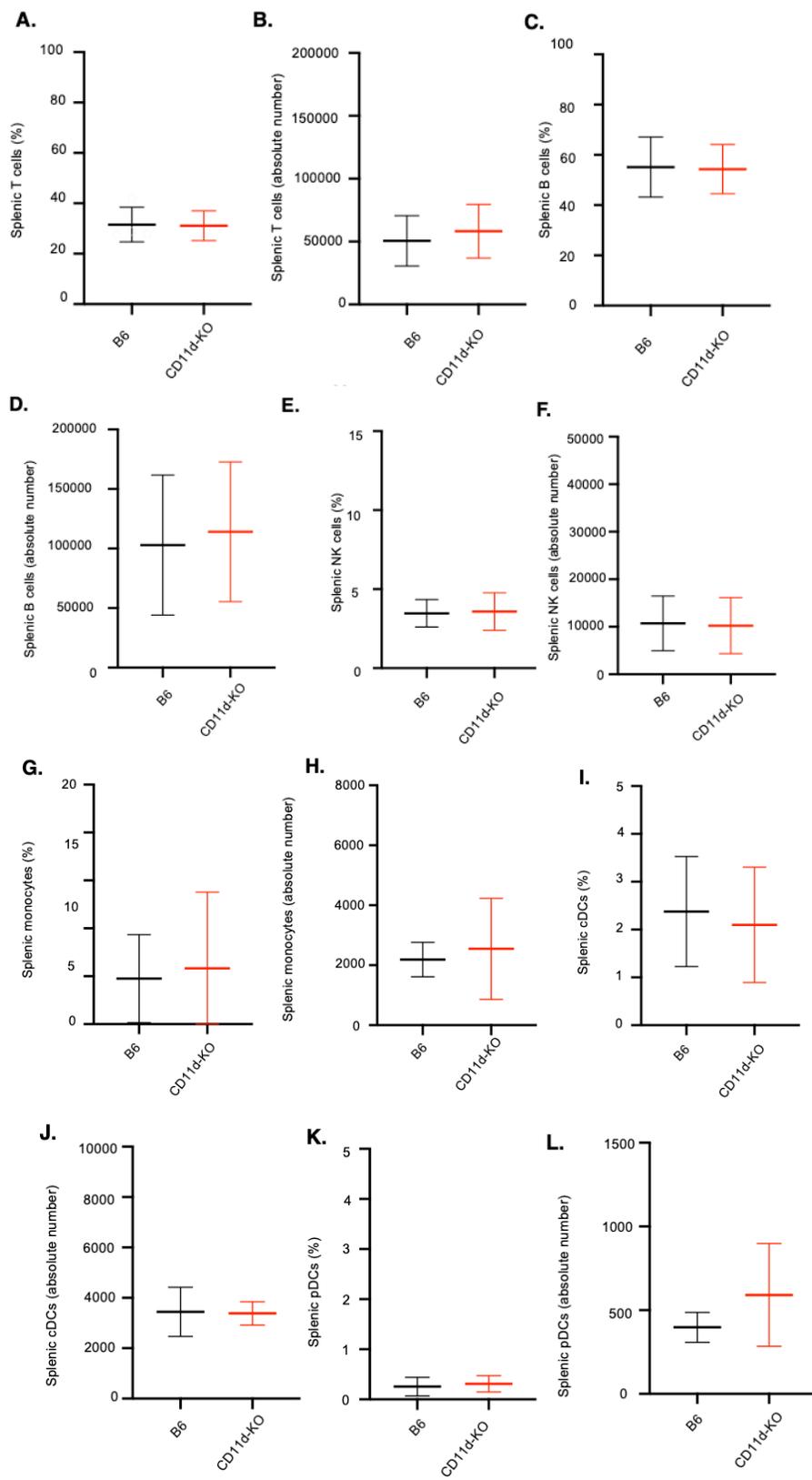


Figure 2. Proportion and absolute number of splenic immune cells are similar in B6 and CD11d-KO mice. The proportion and absolute number of T cells (A, B), B cells (C, D), NK cells (E, F) monocytes (G, H), cDCs (I, J), and pDCs (K, L) were determined by flow cytometry in total spleen cells. Results are shown as mean \pm SD. $n \geq 3$.

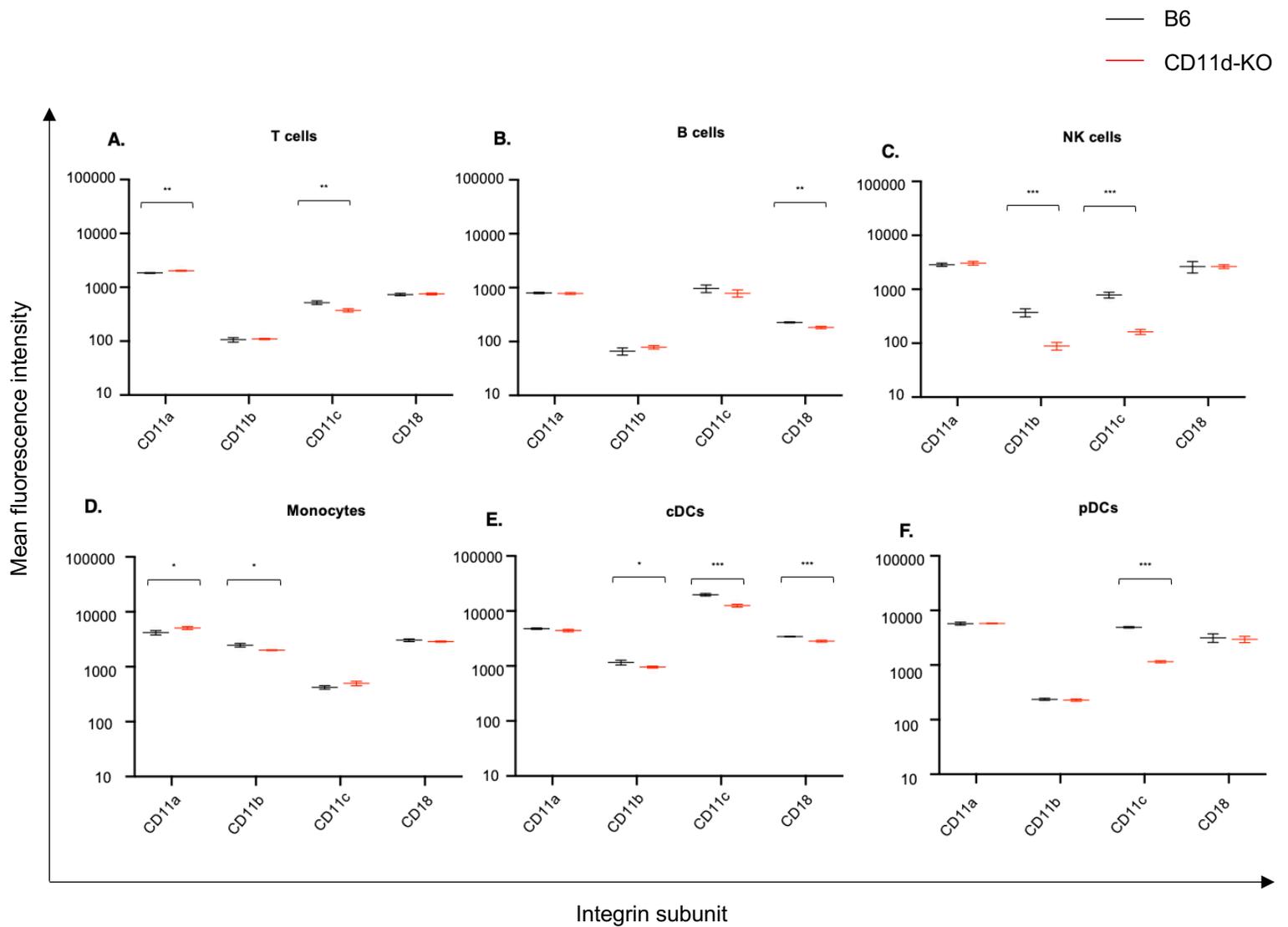


Figure 3. Deletion of CD11d alters the expression of other integrin subunits in immune cells. Mean fluorescence intensity of CD11a, b, c and CD18 in T cells (A) B cells (B), NK (C), monocytes (D), cDCs (E), and pDCs (F.) was determined by flow cytometry. Results are shown as mean \pm SD. $n \geq 3$, * P value < 0.05, ** P value < 0.01, *** P value < 0.001.

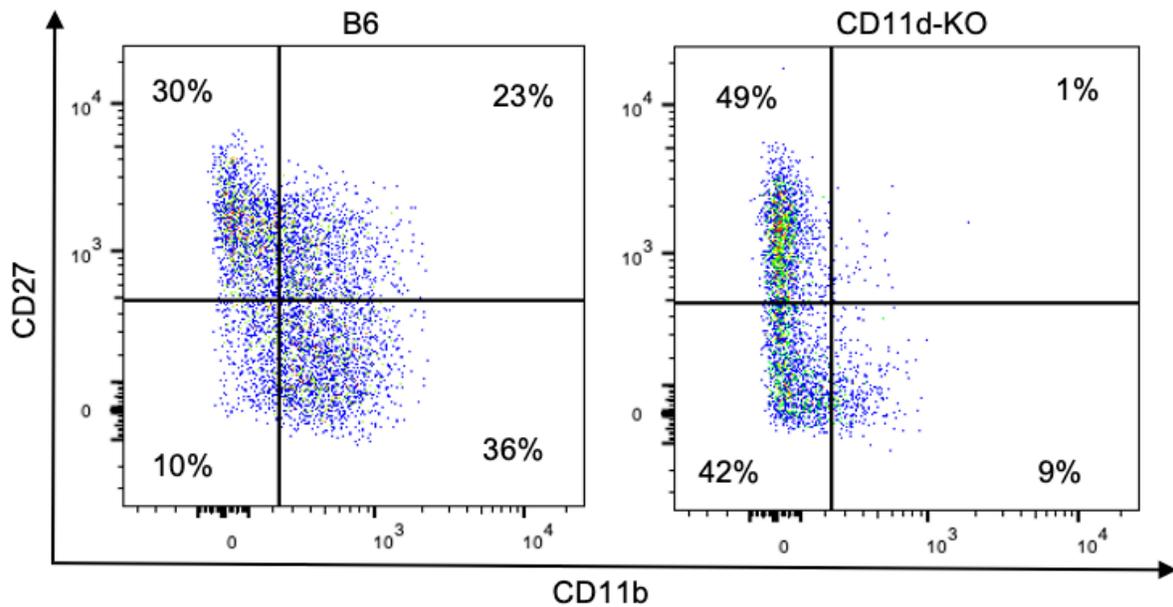


Figure 4. The expression of CD11b is reduced in NK cells from CD11d-KO mice. Representative flow cytometry plot of proportion of CD11b and CD27 NK cells in B6 (left) or CD11d-KO (right) mice. The proportion of CD11b⁺ NK cells in B6 mice throughout functional maturation was 59% (CD11b⁺CD27⁺ and CD11b⁺CD27⁻) as opposed to CD11b⁺ NK cells in CD11d-KO mice (10%). n > 3.

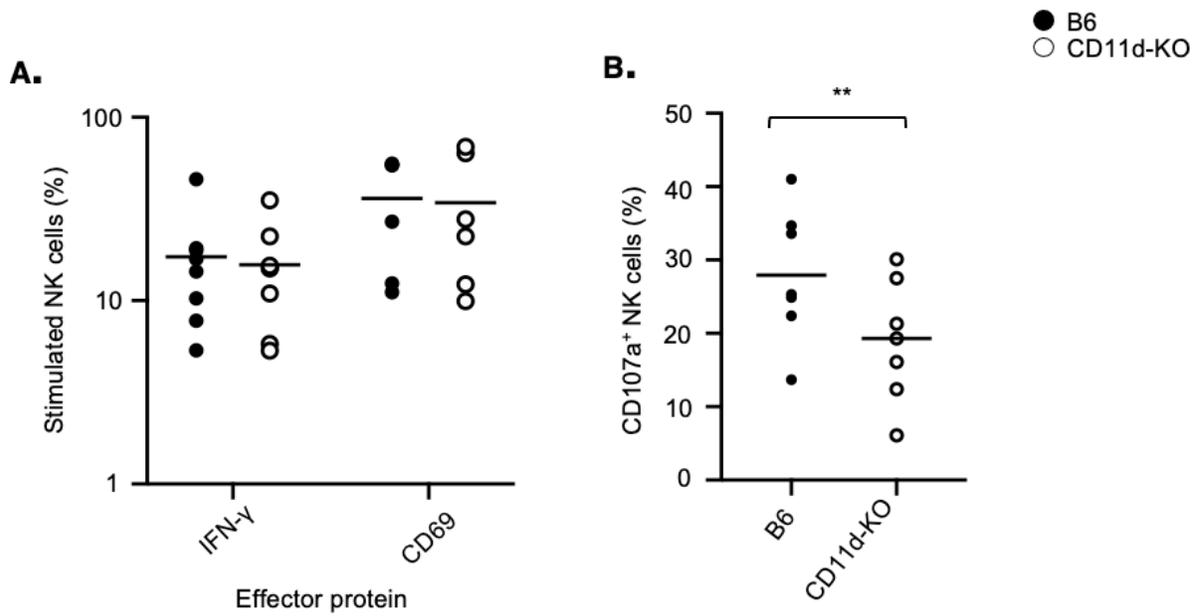


Figure 5. The deletion of CD11d affects NK cell activation. The expression levels of (A) IFN- γ , CD69 and (B) CD107a in NK cells after a four-hour in vitro stimulation with PMA/ionomycin, in B6 and CD11d-KO mice. Each dot represents data from an individual mouse and the line represents the mean. $n = 6$, ** P value < 0.01 .

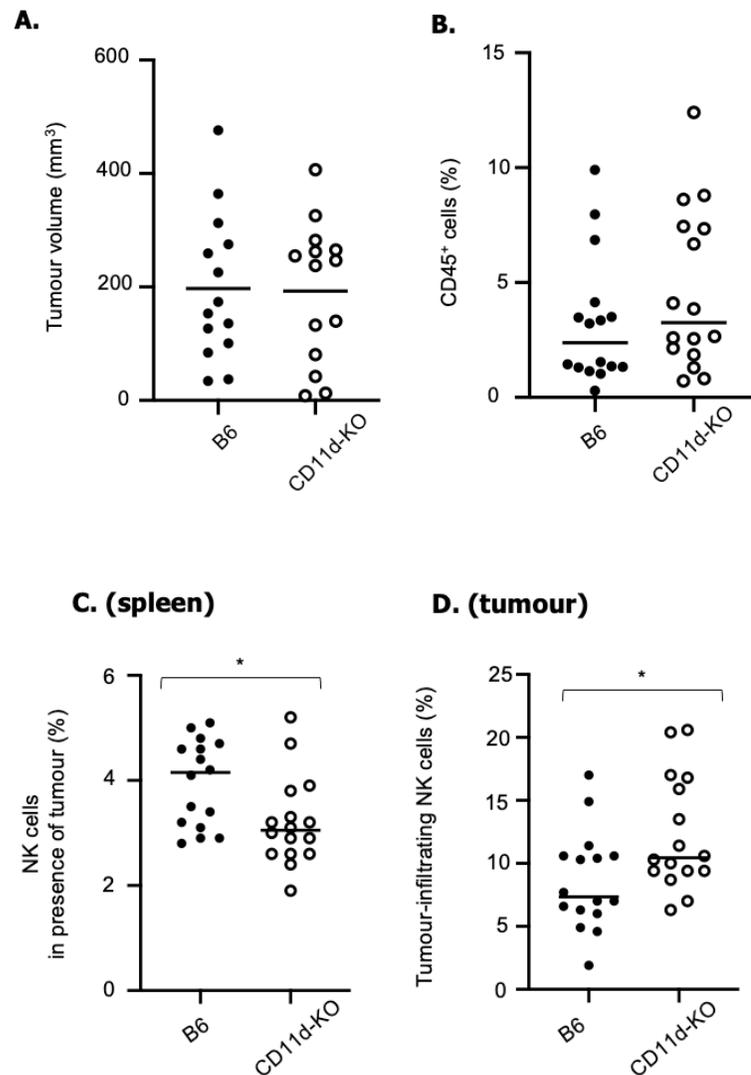


Figure 6. CD11d-KO mice show a higher proportion of NK cells in B16-derived tumors.

A. Quantification of tumor volume after a two-week growth in B6 and CD11d-KO mice. Results are depicted as mean, n = 14, B. Tumour-infiltrating lymphocytes are characterized by the expression of CD45 at the cell surface. n = 16, C. The proportion of NK cells in the spleen of B6 and CD11d-KO mice are depicted, n = 16, D. The mean proportion of tumour-infiltrating NK cells in B6 and CD11d-KO mice, n = 16. Each dot represents data from an individual mouse and the line represents the mean. * *P* value < 0.05

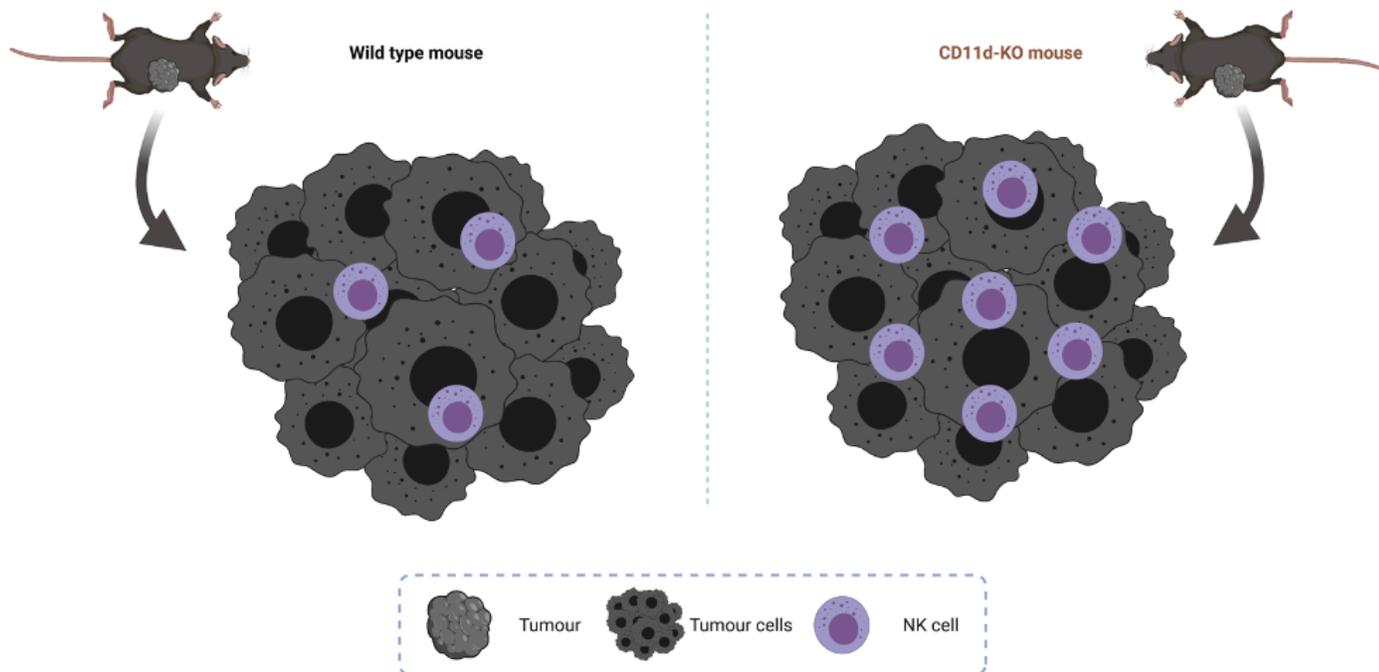


Figure S1. Graphical abstract. The loss of CD11d has a functional consequence on NK cell accumulation in tumours in CD11d-KO mice in comparison to C57BL/6J mice without affecting tumour growth.

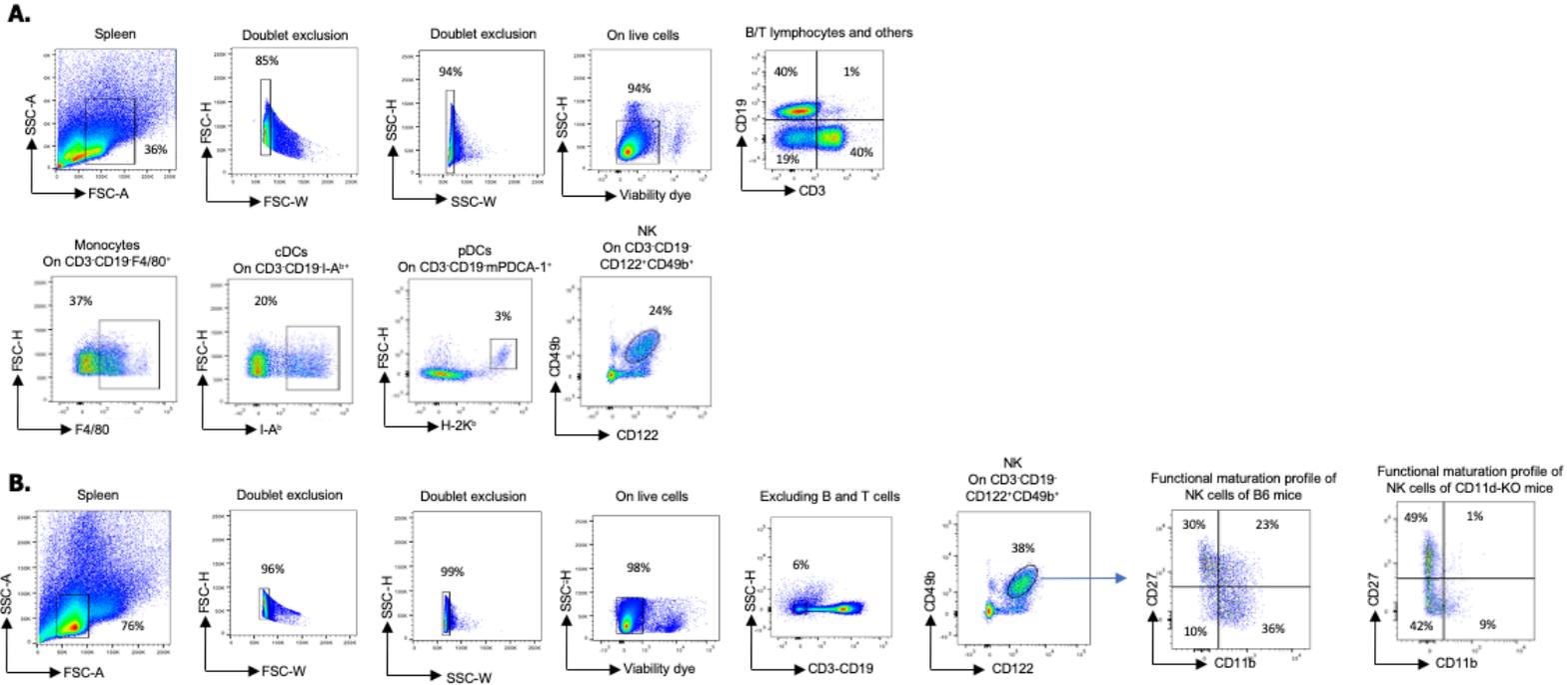


Figure S2. Gating strategies of splenic immune cells. A. Representative flow cytometry plots for B and T cells, monocytes, cDCs, pDCs and NK cells. Following exclusion of doublets and dead cells, the different cells as gated as follows: B cells as CD19⁺, T cells as CD3⁺, monocytes as CD3⁻CD19⁻F4/80⁺, cDCs as CD3⁻CD19⁻I-A^{b+}, pDCs as CD3⁻CD19⁻mPDCA-1⁺ and NK cells as CD3⁻CD19⁻CD122⁺CD49b⁺. B. Gating strategy for functional maturation of total splenic NK cells in B6 and CD11d-KO mice. Following exclusion of doublets and dead cells, CD3⁻CD19⁻CD122⁺CD49b⁺ NK cells are subdivided according to the expression of CD11b and CD27 into four populations: CD11b⁻CD27⁻, CD11b⁻CD27⁺, CD11b⁺CD27⁺, CD11b⁺CD27⁻.

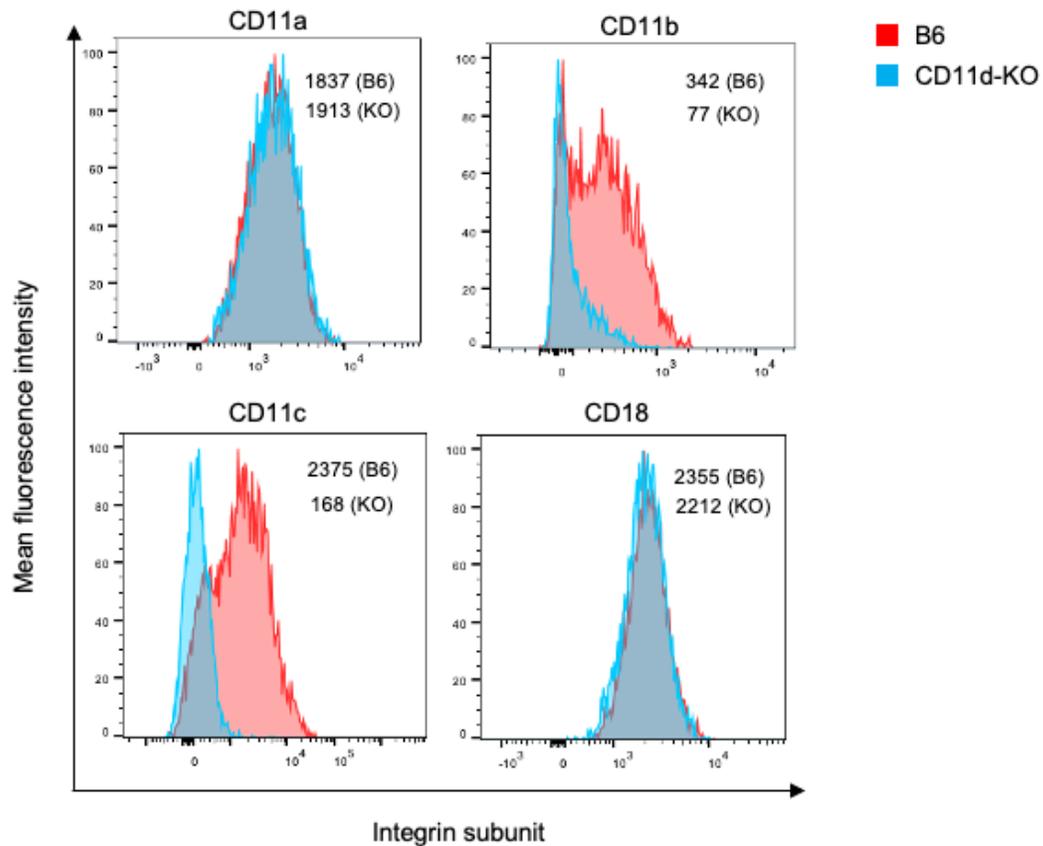


Figure S3. Representative histogram of the mean fluorescence intensities (MFIs) of integrin subunits. CD11a, b, c and CD18 MFIs in NK cells between B6 (in red) and CD11d-KO (in blue) mice. $n > 3$.

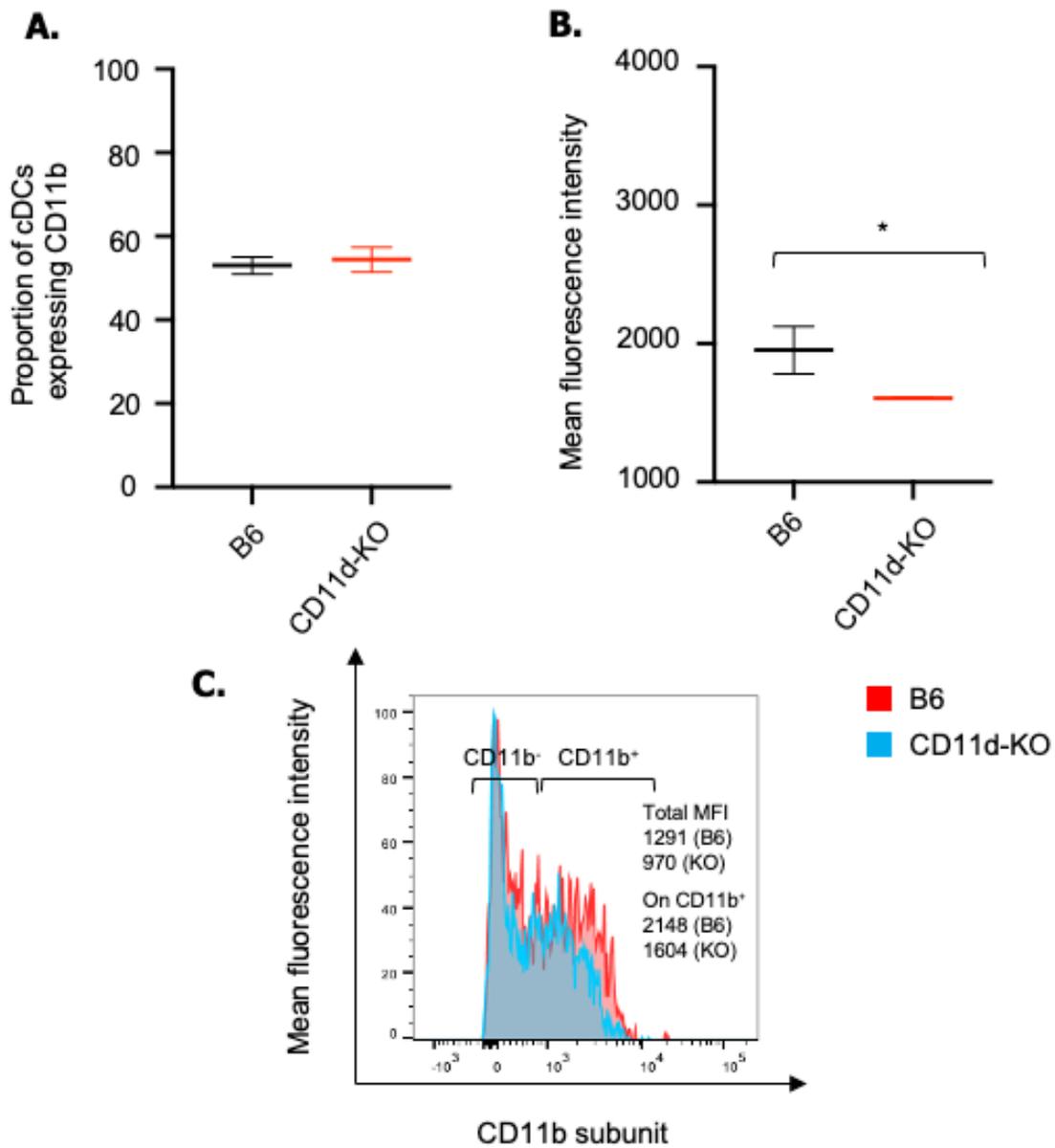


Figure S4. CD11b expression in cDCs. A. Proportion of cDCs expressing CD11b in B6 and CD11d-KO mice, B. The mean fluorescence intensity (MFIs) of CD11b⁺ cDCs in B6 and CD11d-KO mice, C. Representative histogram of MFIs between both lineages. Results are shown as mean \pm SD. n = 3. * *P* value < 0.05

Table 1. qPCR primer (forward and reverse sequences) of integrin subunit genes.

Gene (protein)	Forward Sequence	Reverse Sequence
<i>Itgal</i> (CD11a)	CCCATGTTCTTGCTGACCA	CCTGGCACCAGACTCTTCTTT
<i>Itgam</i> CD11b	ACTGTGATGGAGCAGTTCAAAA	AGGTGAAGTGAATCCGGAACTC
<i>Itgax</i> CD11c	GCTGCAAGCATCATTCGTTAT	ATCGATGCAATGGCCTTTAAT
<i>Itgad</i> CD11d	GCTTCCTGTCATGGGTCTAACCT	ACCAAAGTGCACCACAGTCTGTC
<i>Itgb2</i> CD18	GGGCAACGGAAACAGCTAT	GCCGAAAGTCACATTGAAT

3. CHAPITRE 3 – THE NK CELLS OF NOD MICE EXHIBIT FUNCTIONAL DEFECT THROUGHOUT THEIR MATURATION PROCESS

Maher Al Khaldi*, Victor Mullins-Dansereau*, Geneviève Chabot-Roy, Lise Coderre, Sylvie Lesage.

*Co-premiers auteurs

Nous visons de publier cet article dans *Scientific Reports*. Le manuscrit a donc été préparé selon les lignes directrices du journal.

Ce chapitre représente le deuxième projet auquel j'ai participé durant ma maîtrise. Les expériences in vitro et l'analyse des résultats de ces expériences ont été faites par Victor Mullins-Dansereau. J'ai participé activement à la modification du protocole d'éthique (partie in vivo), aux expériences in vivo avec les tumeurs, à l'analyse de mes données, à montrer les figures de l'article et à la rédaction de celui-ci. Geneviève Chabot-Roy m'a aidé dans quelques expériences in vivo. Le manuscrit a été révisé par Dre Coderre et Dre Lesage. J'évalue ainsi ma participation à 50%.

Ce chapitre est pertinent pour le mémoire, car nous avons réussi à montrer pour la première fois que les cellules NK de la souris NOD ne réussissent pas à acquérir leurs fonctions effectrices pour chaque stade de maturation fonctionnelle en comparaison aux cellules NK de la souris B6. Ce travail contribue à clarifier l'influence du bagage génétique, particulièrement celui augmentant l'incidence de maladies auto-immunes, sur l'altération des fonctions des cellules NK en contexte oncologique.

3.1. Title Page

The NK cells of NOD mice exhibit a functional defect throughout their maturation process

Authors: Maher Al Khaldi*, Victor Mullins-Dansereau*, Geneviève Chabot-Roy, Lise Coderre, Sylvie Lesage.

*Co-first authors

3.2. **Abbreviations**

NOD: Non-Obese Diabetic; B6: C57BL/6; MHC: major histocompatibility complex; PMA: Phorbol-12-Myristate-13-Acetate; Rag: Recombination-activating

3.3. Abstract

NK cells constitute a population of innate lymphoid cells that are important in antitumor immunosurveillance and viral clearance. NK cells of the NOD lineage are functionally less mature than NK cells from C57BL/6 (B6) mice. We hypothesized that impaired functional maturation of NOD NK was accompanied by impaired effector functions throughout functional maturation. We observed a significant decrease in the expression levels of IFN- γ , TNF α and Granzyme B in the NOD mice in comparison to B6 mice throughout every stage of functional maturation. NK cells from NOD mice failed to upregulate the expression of NKG2D after intraperitoneal injection of Poly I: C. To study their functions in vivo, we transferred NOD and B6.*H2^{g7}* NK cells in melanoma-bearing immunocompromised hybrid mice (*Rag1^{-/-}.IL2rgc^{-/-}* x NRG) and demonstrated that CD27⁺ NK cells from both mouse strains accumulate in tumours in similar proportions. Of note, transferred NOD NK cells fail to adequately control tumour growth as opposed to their B6.*H2^{g7}* counterparts despite being phenotypically similar in the spleen and the tumour bed. In conclusion, this study further sheds light on the mechanisms underlying NOD NK-cell dysfunction.

3.4. Introduction

NK cells are innate lymphoid cells which actively participate in antiviral ¹ and antitumor immunosurveillance ². Upon activation, NK cells rapidly produce large amounts of inflammatory cytokines such as IFN- γ and TNF α which in turn induce the recruitment of other immune cells to tissue sites. NK cells can also directly lyse target cells (pathogens and tumour cells) via the production of cytotoxic granules (perforins and granzymes), the expression of death receptors which bind to their corresponding ligands on target cells or by antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) ³.

Conventional murine NK cells are generated from common lymphoid progenitors from the bone marrow. They sequentially differentiate into pre-NK progenitors (pre-NKP) ⁴, then into NKP ⁵ and finally into immature NK (iNK) cells. These cells then migrate from the bone marrow into peripheral lymphoid tissues such as the spleen or lymph nodes where they become mature NK (mNK) cells ^{6,7}. The mNK cells then undertake a final functional maturation process during which they acquire the aforementioned cytotoxic functions ^{6,8,9}. Chiossone et al. have previously subdivided this process into four stages characterized by the expression of the costimulation molecule CD27 and CD11b integrin. Stage 1 is comprised of CD27⁻CD11b⁻ NK cells, followed by stage 2 (CD27⁺CD11b⁻), stage 3 (CD27⁺CD11b⁺) and finally stage 4 (CD27⁻CD11b⁺) ⁸. NK cells from the less functionally mature stages (stages 1 and 2) bear little cytotoxic activity but produce high levels of cytokines and are highly proliferative. Conversely, the cells from stages 3 and 4, which represent the majority of NK cells in the periphery, are highly cytotoxic, but produce less cytokines and are not as proliferative ⁸.

In addition to their predisposition to type 1 diabetes ^{10,11}, Non-obese diabetic (NOD) mice have defective NK cell-mediated functions ¹²⁻¹⁶. Our group previously demonstrated that NK cells of the NOD lineage show a defect in their functional maturation characterized by an accumulation of cells in the earlier stages at the expense of the more functional and therefore more cytotoxic stages ¹⁷. To follow up on these findings, we hypothesized that in addition to this defect in functional maturation, NK cells of the NOD lineage also exhibit a failure to acquire their effector function throughout every stage of the functional maturation process.

In this work, we demonstrated that NOD mice produce lower levels of effectors (IFN- γ , TNF α and Granzyme B) compared to C57BL/6 (B6) mice for every stage of functional maturation. We also examine their activation potential by quantifying the induction of activating receptors NKG2D and DNAM-1 and show that NK cells from NOD mice failed to upregulate both receptors upon in vivo stimulation with Poly IC. Finally, in an in vivo murine melanoma model where B10F16 cells were injected in mice flanks, we show that, similar to B6.*H2^{g7}* mice, NOD CD27⁺ NK cells accumulate preferentially in the tumour bed, but with significantly greater tumour growth.

3.5. Methods

3.5.1. Murine lineages

NOD mice, C57BL/6.2 (B6.2), C57BL/6.1.2 (B6.1.2), B6.NOD-*Idd1* (B6.*H2^{g7}*), NOD, B6.129S4.Rag2-*Il2rg^{tm1Wjl}/J* (Rag.IL2g), NOD.Cg-Rag1^{tm1Mom}*Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ* (NRG) mice were purchased from The Jackson Laboratory. For the in vivo experiments, F1 hybrid mice were generated by crossing Rag.IL2g with NRG mice ((B6xNOD)Rag1^{-/-}.*yc^{-/-}*, referred to as F1 hybrids hereafter). All of these strains were maintained at the Maisonneuve-Rosemont Hospital animal house facility (Montreal, Canada). All mice used were aged between 6 and 12 weeks. The Maisonneuve-Rosemont Hospital ethics committee, overseen by the Canadian Council for Animal Protection, approved the experimental procedures.

3.5.2. Cell preparation and flow cytometry

Spleens were harvested from mice in an isotonic buffer solution. The murine spleens were minced with a sharp sterile blade, placed in a 40- μ m nylon cell strainer (BioBasic) and pressed with the plunger of a 1-ml syringe until mostly fibrous tissue remained. A single cell suspension was then obtained. Erythrocytes were lysed with buffered ammonium chloride solution (NH₄Cl). Immune cells were resuspended in an isotonic buffer solution (10% phosphate buffered saline (PBS), 2% deactivated fetal calf serum (SVF) and 0.05M EDTA) and counted before antibody staining. Flow cytometry readings were performed on the LSRII or BD LSRFortessa™ X-20 Flow Cytometer and then analyzed using FlowJo software (Tree Star).

3.5.3. Antibodies (Abs)

All Abs were purchased from BioLegend, unless indicated otherwise. Samples were stained with combinations of the following Abs: Zombie Aqua fixable viability dye), Zombie Yellow fixable dye (ThermoFischer), CD3 ϵ -BV711 (clone 17A2), CD19-BV711 (clone 6D5), NKp46 (CD335)-BV421 (clone 29A1.4), NKp46-PE/Dazzle 594 (clone 29A1.4), CD49b-Biotin (clone DX5), CD49b-Pacific Blue (clone DX5), CD122-APC (clone 5H4), CD122- PE/Dazzle 594 (clone 5H4), CD11b-APC-Cy7

(clone M1/70), CD27-PerCP-Cy5.5 (clone LG.3A10), CD27-PE-Cy7 (clone LG.3A10) CD69-PE (clone H1.2F3), CD107a-FITC (clone 1D4B), Granzyme B-PE (Invitrogen, clone MGZB), TNF α -PE (clone MP6-XT22), IFN- γ -APC (clone XMG1.2), NKG2D (CD314)-PE (clone CX5), DNAM-1 (CD226)-APC (clone 10E5), CD45-BV650 (clone 2D1), CD45.1-FITC (clone A20) and CD45.2-Pacific Blue (clone 104).

Dead cells were excluded using either Zombie or Yellow viability dyes. T cells were identified as CD3 ϵ^+ , B cells as CD19 $^+$, NK cells as CD3 ϵ^- CD19 $^-$ NKp46 $^+$ or CD3 ϵ^- NKp46 $^+$ according to experiment. Immune cells in tumours were identified as CD45 $^+$ and tumour-infiltrating NK cells (TINKs) as CD45.1.2 $^+$ CD3 ϵ^- CD19 $^-$ NKp46 $^+$ CD122 $^+$ or CD45.2 $^+$ CD3 ϵ^- CD19 $^-$ NKp46 $^+$ CD122 $^+$ if derived from B6.1.2 or B6.2 mice, respectively. NK cells from NOD mice were identified as CD45.1 $^+$ CD3 ϵ^- CD19 $^-$ NKp46 $^+$ CD122 $^+$. CD11b and CD27 were used for NK-cell functional maturation.

3.5.4. Positive selection of NK cells by magnetic beads

Splenic B6 or NOD immune cells obtained with the same method above were suspended in an isotonic buffer solution and prepared at a concentration of 2×10^7 cells/ml. NK cells, stained with biotin-coupled anti-CD49b, were isolated using a biotin StemCell separation kit, following manufacturer's instructions. Autoimmune diabetes in NOD mice is associated to insulinitis, a highly inflammatory state. Because the proportion and absolute number of NK cells are influenced by an ongoing inflammatory response ¹⁸ and that NK cell functions are impaired in diabetes ¹⁹, diabetic NOD mice were precluded from experiments by urine dipstick analysis prior to harvesting the spleens.

3.5.5. Cell sorting of CD27 $^+$ and CD27 $^-$ NK cells

Cells were first magnetically separated by negative selection by excluding biotin-stained CD3 $^+$ CD19 $^+$ cells. Selected CD3 $^-$ CD19 $^-$ cells from B6.1.2, B6.2 or NOD mice were stained with Zombie Aqua fixable viability dye, DX5-FITC and CD27-PE and sorted with the BD FACS-Aria III, with purities >90% for CD3 $^-$ CD19 $^-$ CD49b $^+$ NK cells expressing or not CD27.

3.5.6. In vitro NK cell activation using PMA and ionomycin

To quantify cytotoxic effectors by flow cytometry, NK cells were obtained from magnetic separation and placed in a 96-well plate at equal quantities. After adding 150 µl of isotonic buffer into each well and centrifuging the plate, the supernatant was removed by inversion and the cells were resuspended in 100 µl of complete RPMI medium (ATCC) (10% FBS, 1% penicillin/streptomycin, 1% β-mercaptoethanol and 0.1% HEPES) supplemented with 500 ng/ml of ionomycin and 10 µg/ml of PMA for 6 h. Two µl of CD107a-FITC was also added in the wells used for NK degranulation assay. The cells were subsequently preincubated at 37°C for 1 hour, after which 100 µl of brefeldin A (BFA) solution was added to all wells for a final concentration of 5 µg/ml. The plate was then incubated at 37°C for additional 5 hours. Following incubation, the cells were centrifuged and washed twice with isotonic buffer containing 0.05% sodium azide before staining for surface and intracellular markers.

3.5.7. In vivo stimulation with polyinosinic-polycytidylic acid (Poly I:C)

Mice were injected intraperitoneally (IP) with 200 µl of Poly I:C (200 µg) or PBS (for controls) 18 hours prior to sacrificing for spleen harvesting.

3.5.8. Surface and intracellular staining of NK cell cytotoxic effectors

For surface staining, 1×10^6 cells or less were deposited in individual wells of a 96-well plate. The Abs listed above were deposited in control wells for single staining and corresponding wells at a concentration previously determined by titration. The cells were then incubated at 4°C for 30 minutes. They were then washed with isotonic buffer and resuspended in isotonic buffer for data acquisition with flow cytometry.

Following extracellular staining, the cells were resuspended in 100 µl of the fixation/permeabilization solution (Kit Cytofix/Cytoperm, BD Biosciences), diluted at 1/10 with distilled water, and were incubated at 4°C for 30 minutes. After cell fixation and permeabilization, the BD Perm/Wash™ Buffer was used to wash the cells and to dilute the anti-cytokine antibodies

for staining in corresponding wells. The cells were again incubated for 30 minutes at 4°C. Following this last incubation, the cells were washed twice, then resuspended in 100-150 µl of isotonic buffer for flow cytometry.

3.5.9. Tumour cell line maintenance and injection, tumour measurement and preparation

B6F10 (B16) melanoma cell line was purchased from ATCC and cultured in complete DMEM medium (DMEM supplemented with 5% FBS, 1% penicillin/streptomycin, 1% HEPES, 0.1% β-mercaptoethanol) on an adherent surface (Sarstedt) and maintained at 37°C in an incubator with 5% CO₂. Periodic cellular passing was performed when reaching 70-90% cellular confluence. When ready for use, B16 cells were enzymatically dissociated with trypsin, washed, resuspended in PBS and counted. Under general anesthesia (isoflurane 2.5%, oxygen 2%), left flanks of F1 hybrid mice were shaved and injected subcutaneously with 2x10⁵ melanoma cells.

Tumours were measured 3 times per week with a caliper (width, length) until mice were sacrificed. Tumour volume was estimated with the following formula: (length x width²)/2. The mice were followed up for a period of two weeks after which they were sacrificed, and their tumours and spleens were harvested. Tumours were cut into small pieces and digested with 25 mg/mL of collagenase D (Sigma-Aldrich) supplemented with 100 µl of DNase I at a concentration of 1 mg/mL (Sigma-Aldrich) at 37°C for 15 minutes. Erythrocytes were lysed with NH₄Cl. Single-cell suspensions from spleens were prepared following the method described above.

3.5.10. Statistical analysis

Normality was verified with the Shapiro-Wilk test. *P* values were calculated using unpaired two-tailed Student's *t*-test for normal distribution or Mann-Whitney U test otherwise. GraphPad Prism software version 8 was used for statistical and graphical analyses. Significance was accepted at *P* values <0.05 (**P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001).

3.6. Results

3.6.1. NOD NK cells fail to acquire effector functions throughout their functional maturation

NK cells can rapidly produce large quantities of proinflammatory cytokines such as IFN- γ and TNF α as well as cytotoxic granules (GzmB), inducing apoptosis of target cells. Given the crucial role of these effectors at shaping NK cell function, we first compared their intracellular expression between B6 and NOD mice after 6-hour ex vivo stimulation with PMA/ionomycin.

We observed a drastic decrease in the levels GzmB in total NOD NK cells compared to B6 NK cells (10% vs 50%) (Fig. 1a). Because previous studies showed that the most functionally mature NK cells are also the most cytotoxic ⁸ we next studied GzmB expression during the functional maturation process. As expected, we observed an increase in intracellular expression of GzmB in the last two stages (CD27⁺CD11b⁺ and CD27⁻CD11b⁺) in B6 mice. In contrast, GzmB expression from NOD NK cells remained at very low level throughout all stages. These results show that the cytotoxicity defects observed in NOD NK cells are not simply due to a block in their functional maturation process.

Unlike their cytotoxic capacity, the cytokine production potential of NK cells is mainly attributed to the less functionally mature cells (stage 1 and 2) ⁸. Concordant with previous study, in B6 mice TNF α expression is predominant in the least mature CD27⁻CD11b⁻ and CD27⁺CD11b⁻ NK cell subsets. (Fig. 1b). Similar to GzmB, total NK cells from NOD mice expressed significantly less TNF α than total NK cell population of B6 mice. In fact, the percentage of NOD NK cells expressing TNF α is low throughout the functional maturation (<5% of positive cells) with most noticeable differences observed in the first two stages of maturation between both lineages.

Unlike cytokines such as TNF α , the expression of IFN- γ in B6 mice predominantly occurs in the most functionally CD11b⁺ NK cell subset ⁶. Accordingly, we observed an increase in IFN- γ expression in the last two stages (CD27⁺CD11b⁺, CD27⁻CD11b⁺), thus resembling the profile GzmB (Fig. 1c). Conversely, NK cells from NOD mice consistently showed less IFN- γ expression throughout all stages. Once again, while the percentage of IFN- γ -expressing NK cells increased in

B6 mice during maturation, it remained the same throughout all stages in NOD mice. These results suggest that NOD NK cells fail to induce adequate expression of TNF α and IFN- γ .

Finally, we examined the degranulation potential of NK cells by characterizing the expression of the CD107a vesicular protein. NOD CD27⁺CD11b⁻ NK cells degranulated more in comparison to their B6 counterpart (Fig. 1d). Although NOD NK cells show a tendency for increased expression of CD107a, their production of GzmB upon stimulation remains low as stated previously. Altogether, the results demonstrate that the functional defects observed in the total NOD NK cell population is not simply caused by a defect in functional maturation, but also by a defect in the acquisition of their effector functions.

The NOD mouse is a well-established model of spontaneous autoimmune diabetes. Since it is a highly inflammatory disease, we sought to determine whether the strong inflammation caused by the disease was in part responsible for the functional defects of NK cells in NOD mice. To do so, we exploited the NOD.Rag model which lacks T and B cells and therefore lymphocyte-induced insulinitis and diabetes²⁰. Overall, we observed similar defects in the B6.Rag and NOD.Rag strains as those described for B6 and NOD mice (Fig. 2). While late stage NK cells in B6 mice show elevated levels of GrzmB, the expression of GzmB of NOD.Rag NK cells remained low throughout functional maturation (Fig. 2a). CD27⁻CD11b⁻ NOD.Rag NK cells also secreted significantly less TNF α than their B6.Rag counterpart (Fig. 2b). In addition, the proportion of IFN- γ -expressing NK cells of the NOD.Rag line was decreased compared to B6.Rag mice (50% vs. 70% respectively, $p < 0.001$) for the total NK cell population and for cells of every stage of functional maturation (Fig. 2c). Finally, we observed a similar expression of CD107a between B6.Rag and NOD.Rag NK cells across all stages and for total NK cells (Fig. 2d). Altogether, these results demonstrate that the defects in GzmB, TNF α and IFN- γ secretion observed in NOD mice are not caused by the inflammatory state caused by the autoimmune diabetes.

3.6.2. NOD NK cells fail to upregulate NKG2D expression throughout functional maturation

In order to further characterize the functional variations between the NK cells from the B6 and NOD mice, we studied their activation potential via the expression of surface receptors. Because of its crucial role in the cytotoxic activation of NK cells, Natural Killer Group 2D (NKG2D) receptor is considered as one of the main activation receptors ²¹. Ogasawara et al. have previously established that at baseline NKG2D expression levels were similar between the B6 and NOD NK cells, but that following ex vivo stimulation with IL-2, NOD NK cells express significantly less NKG2D than their B6 counterparts ¹². To address this question, we injected Poly I:C 18 hours before cytometric studies as a viral ligand mimic²⁰. We did not notice a difference in NKG2D expression between NK cells from both murine lineages under neutral condition (i.e. PBS). Furthermore, the percentage of total NK cells expressing NKG2D from mice stimulated with Poly I:C was similar between B6 and NOD mice (data not shown). These results were not surprising since the NKG2D is expressed ubiquitously on all mature NK cells. However, when quantifying the expression of the receptor by mean fluorescence intensity (MFI), a significant difference in the expression of NKG2D was noticed (Fig. 3a). While B6 NK cells increased the expression of the receptor by 2.5 times following Poly I:C activation, NOD NK cells were unable to induce its expression, remaining at the same level as in neutral condition (PBS). The inability to upregulate NKG2D expression was noticed for the total as well as all four NK functional maturation stages. In addition, the B6 NK cells were capable of upregulating their expression of NKG2D in response to Poly I:C stimulation at every stage. These results demonstrate that NOD NK cells fail to upregulate NKG2D adequately in response to Poly I:C.

Another important NK cell activation receptor is DNAX Accessory Molecule-1 (DNAM-1) which plays a role in tumour development and immunosurveillance ²², but also in the survival of NK cells following mouse cytomegalovirus (MCMV) infection ²³. Our results show similar DNAM-1 expression in NK cells of the B6 and NOD lineages under neutral condition (data not shown). There were no differences in DNAM-1 expression in stages 1 (CD27⁻CD11b⁻), 2 (CD27⁺CD11b⁻) and 3 (CD27⁺CD11b⁺) following activation with Poly I:C (Fig. 3b). There was however a significant upregulation of DNAM-1 in B6 NK cells in the last stage (CD27⁻CD11b⁺) and for total NK cells in comparison to NOD mice. Overall, these results reveal that stage 4 NOD NK cells fail to adequately induce the expression of DNAM-1 following Poly I:C injection in comparison to B6 mice.

3.6.3. NOD CD27⁺ NK cells accumulate in B6F10 tumours

To examine NK cell function in vivo, we aimed to compare how the genetic background of NK cells influenced the growth of B6 derived B6F10 (B16) murine melanoma cells ²⁴. Of note, the NOD mouse bears the *H2^{g7}* major histocompatibility complex (MHC) haplotype, which differs from that of the B6 mouse (*H2^b*). As such, B16 melanoma are rapidly rejected upon grafting in NOD mice, due to an alloreaction against *H2^b*. To circumvent this issue, we generated an F1 hybrid mouse expressing both MHC haplotypes (*H2^{b.g7}*) by crossing B6.Rag.IL2g and NRG mice. Both the B6.Rag.IL2g and NRG mice have a mutation in the recombination activating gene-1 (Rag1) and in the cytokine common γ chain. The resulting F1.Rag1^{-/-} γ c^{-/-} hybrid is therefore devoid of any adaptive immune system (T cells, B cells and NK cells) ²⁵⁻²⁷, precluding alloreactivity to the B16 melanoma. In addition, the co-dominant expression of both MHC haplotypes will allow the effective study of NK cells, which can be transferred from either B6 or NOD mice.

Using the F1 hybrids, we first wanted to determine how each NK cell subset behaves in vivo in B6 and NOD mice. As the number of NK cells from each NK cell subset is low, we opted to separate NK cell subsets based on CD27 expression. As such, stages 2 and 3 (CD27⁺CD11b⁻ and CD27⁺CD11b⁺) were compared to stages 1 and 4 combined (CD27⁻CD11b⁻ and CD27⁻CD11b⁺), corresponding to CD27⁺ and CD27⁻ populations respectively. Note that CD27⁻ cells are primarily composed of stage 4 cells, with very few stage 1 cells. It has previously been demonstrated that as they mature, splenic NK cells from B6 mice lose CD27 expression ²⁸, while stage 2 NK cells (CD27⁺CD11b⁻) accumulate in B16 tumour ²⁹⁻³¹. However, to our knowledge, no such comparison has been previously reported with NOD NK cells. To determine how CD27⁺ (stages 2 and 3) NOD NK cells behave in vivo as opposed to the more cytotoxic CD27⁻ (mainly stage 4) cells in comparison to B6 NK cells, we examined the proportion of CD27⁺ and CD27⁻ NK cells in the spleens and tumours of B6 and NOD mice. In the spleen, B6 CD27⁺ NK cells injected in the F1 hybrid B16 tumour bearing mice lost the expression of CD27 in favour of the more mature stage 4 (69% became CD27⁻) (Fig. 4a). Similarly, 53% of splenic NOD CD27⁺ NK cells converted to CD27⁻ after their transfer to the F1 mice (Fig 4a). In contrast, tumours of mice injected with B6 CD27⁺ NK cells and NOD CD27⁺ NK cells harboured mostly CD27⁺ NK cells. Indeed, only 36% and 29% of TINKs

were CD27⁻ from the B6 and NOD backgrounds, respectively (Fig. 4b). NK cells in tumours of mice injected with B6 CD27⁻ cells were undetectable (UD, n = 5) and only 31% of TINKs were CD27⁻ in hybrid mice injected with NOD CD27⁻ cells. Altogether, these results demonstrate that in presence of B16 tumours, NK cells from NOD mice behave in a similar manner as their B6 counterpart and lose their expression of CD27⁺ in the spleen after in vivo transfer. CD27⁺ NOD NK cells preferentially accumulate in tumour beds as their B6 counterpart.

3.6.4. Transferred NOD NK cells fail to adequately control tumour growth as opposed to their B6 counterparts despite being phenotypically similar to them

We next sought to study which stages of NK cells preferentially accumulate in tumours in addition to studying the antitumour potential of B6 NK cells in comparison to NOD NK cells. Because total splenic NK cells were injected in tumour-bearing F1 hybrids, similar proportions across all stages of functional maturation were needed to address our question. Following tumour inoculation, F1 hybrids were injected with NK cells from MHC-matched B6.*H2^{g7}* and NOD mice in which NK cells follow a similar distribution across all stages of functional maturation (Fig S3). There was a tendency for mice injected with NOD NK cells to have greater tumour size in comparison to those injected with B6.*H2^{g7}* NK cells (924.1 mm³ vs. 202.5 mm³, *P* = 0.06) (Fig. 5). This result suggests that NOD NK cells are less efficient than NK cells from B6.*H2^{g7}* mice at controlling tumour growth.

After 14 days of tumour growth, the total NK cells from donor B6.*H2^{g7}* or NOD mice were tracked in the spleen and tumour of the F1 hybrids. The proportion of NK cells for every stages of functional maturation were similar between both lineages in the spleen (Fig. 6a) and in the tumour (Fig. 6b). Prior to their injection in host mice, spleens of B6.*H2^{g7}* and NOD mice harbour mostly stage 3 (CD11b⁺CD27⁺) NK cells (Fig. S3). After their transfer, NK cells from both mice strains lose their expression of CD27, increasing the proportion of CD11b⁺CD27⁻ NK cells (55% of stage 4 B6.*H2^{g7}* NK cells vs. 46% of stage 4 NOD NK cells), recapitulating our previous findings that compared NK cells from B6 and NOD mice (Fig 6a). When contrasting the different stages of NK

cells in the spleen and tumour, similar tendencies were noticed between both lineages (Fig 6c, d). While the proportion of CD11b⁻CD27⁻ and CD11b⁻CD27⁺ NK cells from B6.H2^{g7} mice are comparable in tumours and spleens, the tumours contained significantly more CD11b⁺CD27⁺ NK cells as opposed to spleens (26% vs. 10%, $P = 0.029$), but less CD11b⁺CD27⁻ NK cells in comparison to the spleens (31% vs. 55%, $P = 0.019$) (Fig. 6c). A similar tendency, although non-significant, was noticed with NOD NK cells (Fig 6d). Altogether, these results demonstrate that the functional maturation phenotype of NK cells from B6.H2^{g7} and NOD mice are similar, both ex vivo and after transfer in vivo. Moreover, NK cells from both strains effectively home to the tumour, by NOD NK cells are less effective at controlling tumour growth.

3.7. Discussion

NOD NK cells have significant functional defects that we previously attributed to a deficiency in their functional maturation process preventing an optimal cytotoxic phenotype¹⁷. A comprehensive analysis of the levels of key cytotoxic effectors, that is IFN- γ , TNF α and GzmB, indicated that in addition to a defective functional maturation, NOD NK cells fail to acquire effector functions in comparison to B6 NK cells. Although we observed a trend in increased CD107a expression in total NOD NK cells in comparison to B6 NK cells, GzmB production by total NK cells was significantly decreased in NOD mice. We were also able to show that NOD NK cells are incapable of inducing the expression of the activation receptor NKG2D in response to Poly I:C, thus correlating with the defective expression of cytotoxic effectors. DNAM-1 expression was also altered. Moreover, through an in vivo melanoma model, we demonstrated that while CD27⁺ NK cells from the B6.H2^{g7} and NOD backgrounds differentiate and acquire a CD11b⁺CD27⁻ NK cell phenotype, CD27⁺ NK cells from both lineages preferentially accumulate in B16 tumours. Lastly, transferred NOD NK cells were less efficient at controlling tumour growth as opposed to their B6.H2^{g7} counterparts despite being phenotypically similar in the spleen and tumour bed.

The NOD mouse is an interesting model for the study of autoimmune diseases and is an important tool for dissecting the mechanisms of immune tolerance. Because NOD NK cells are defective, it represents a suitable model for understanding the genetic factors involved in the biology of these cells. The first indication of such a defect was observed among splenocytes with a reduced in vitro capacity to kill the Yac-1 lymphoma cell line^{15,32}. One proposed mechanism is related to the activating receptor NKG2D. In NOD mice, although NKG2D expression is comparable to B6 mice at steady state, there is inappropriate upregulation of its Rae-1 ligand, an export protein, in inflammatory contexts that cause its binding to NKG2D and subsequent internalization of the receptor, compromising the cytotoxic activity of NK cells¹². Our results align with this mechanism of receptor modulation as the levels of NKG2D were not upregulated in NOD NK cells after their stimulation with Poly I:C for the total NK cells and throughout every stage of functional maturation. On another note, our group has recently revealed *Trp53* as a candidate gene involved in NK-cell maturation. We observed a decreased expression of p53 in CD11b⁻CD27⁻, CD11b⁻CD27⁺,

and CD11b⁺CD27⁺ NK cells from NOD mice relative to B6.*H2^{g7}* mice³³. Although the function of NK cells deficient for p53 was not assessed, it still remains a candidate gene affecting NK-cell function as it is inherently linked to functional maturation¹⁷.

NKG2D-dependent IFN- γ production has been previously reported to be significantly decreased in NOD mice in comparison to B6 mice after their stimulation with anti-NKG2D monoclonal Abs¹², which is consistent with our results. Brauner et al. studied the phenotype and function of pancreatic NK cells in NOD mice. They demonstrated that upon in vitro stimulation with PMA/ionomycin, pancreatic NOD NK cells were hyporesponsive producing low amounts of IFN- γ and showed a poor capacity to degranulate with even lower amounts of CD107a³⁴. Of note, the same study reported that splenic NOD NK cells degranulated slightly more than B6 NOD NK cells, which recapitulates our findings. However, GzmB production was not measured in Brauner's study. Although our study was performed on splenic NK cells, our results, once again are consistent with the literature. Our study adds to the previous ones by confirming that not only do total NOD NK cells are less cytotoxic, but they are so at every stage of functional maturation.

Systemic dysfunction of NK cells has been described in animal models for auto-immune diabetes¹⁹. To address the possibility of type I diabetes contributing to our observed results, we exploited the B6.Rag and NOD.Rag models. These mice have a targeted mutation of the Recombination-activating (*Rag*) gene, which renders them B- and T-cell deficient. This precludes an autoreactive insult on pancreatic beta cells by CD4⁺ and CD8⁺ T cells which would usually lead to insulinitis and spontaneous type 1 diabetes²⁰. However, our results from these mice corroborated those from B6 and NOD mice. Therefore, the functional defects of NOD NK cells throughout every stage of functional maturation are not due to the development of an inflammatory state caused by diabetes.

We noticed that CD27⁻ NK cells were the highest in proportion in the spleens after their transfer into the F1 hybrids. However, the most abundant phenotype of NK cells in the tumour bed was CD27⁺. This was noted with NK cells from the B6.*H2^{g7}* and NOD mice. It has already been documented that upon their transfer, B6 CD27⁺ NK cells transform into CD27⁻ NK cells after several weeks in the spleen²⁸. Herein, we report similar findings with NOD CD27⁺ NK cells. Furthermore,

injected CD27⁻ NK cells were less readily detected in tumours as opposed to CD27⁺ NK cells. Wendel et al. have previously reported that NK cell accumulation in tumours in B6 mice is dependent on IFN- γ and that CD27⁺ NK cells predominantly accumulate in MHC class I-deficient RMA-S lymphoma and B16 melanoma cells transduced with the NKG2D ligand RAE-1q²⁹. Ballas et al. demonstrated that hepatic CD11b⁻CD27⁺ NK cells showed the highest lytic activity against B16 target cells in vitro³⁰. Paul et al. reported that B16-induced melanoma recruits the CD11b⁺CD27⁺ subset of NK cells at an early stage during tumour development in B6 mice³¹. These results suggest that CD27⁺ NK cells predominantly accumulate in tumours, where they can exhibit effective antitumor activity. Nevertheless, these results could be organ- and tumour-dependent. For instance, CD27⁻CD11b⁻ NK cells are the dominant sub-population in a murine Lewis lung cancer model³⁸ whereas the MCA205 fibrosarcoma murine line recruits mostly CD27⁺CD11b⁺ NK cells³⁹.

The detection of injected CD27⁻ NK cells in tumour-bearing F1 hybrids was not possible for NK cells from B6.H2^{g7} mice and possible only to a certain degree for NOD NK cells. This could be explained by how mostly CD27⁺ NK cells infiltrate melanoma tumours as previously explained. Our data is in accordance with the previous study by Lakshmikanth et al. in which they were unable to recover large numbers of NK cells among tumour-infiltrating leukocytes⁴⁰. It is also possible that CD27⁻ cells survive less in tumours. It will be important to determine in future studies whether different subsets of NK cells are recruited in a similar fashion in distinct tumours and whether tumour infiltrates change over time.

There was a trend distinguishing tumour size between F1 hybrids injected with B6.H2^{g7} NK cells and NOD NK cells. Our results go in hand with previous in vitro studies where NK cells from NOD mice were not effective at lysing NK-sensitive tumor cell targets such as Yac-1 and K562 cells¹³⁻¹⁵. When analyzing the intra-tumoural infiltrates, NK cells from the NOD background followed the same pattern as B6.H2^{g7} NK cells in the spleen and in the tumour. However, despite the ability of NOD NK cells to adequately infiltrate tumours, our results confirm that their deficiencies noted in vitro are potentially reflected in vivo, but further studies are required to confirm that.

Collectively, our findings demonstrate that in addition to a block in functional maturation previously observed, NK cells of NOD mice, are also incapable of effectively acquiring effector functions during their maturation. Although NOD NK cells infiltrate B16 tumours in a similar fashion as B6.*H2^{g7}* NK cells in vivo, the former fail to adequately control melanoma growth. These results therefore suggest the alteration of several pathways controlling their maturation and their cytotoxicity. Ultimately, a better understanding of these mechanisms could lead to the enhancement of NK cell-based immunotherapies.

3.8. Authorship

VMD and MAK conceptualised and performed experiments, analyzed data, created figures, and wrote the original manuscript. GCR performed and supervised several experiments. LC reviewed and edited the paper. SL conceptualized the project, reviewed and edited the manuscript.

3.9. Acknowledgments

This work was supported by research funds from the Cancer Research Society to S.L. (20379, 23188) and the Canadian Institutes of Health Research (PJT152952). S.L. is a Research Scholars Emeritus awardee from the Fonds de la recherche en santé du Québec. We would like to thank the animal house staff for curating the colonies, and Martine Dupuis for expert advice on flow cytometry.

3.10. Conflict of Interest/Disclosure

The authors declare no conflict of interest.

3.11. References

1. Biron, C. A. Activation and function of natural killer cell responses during viral infections. *Curr Opin Immunol* **9**, 24–34 (1997).
2. Cheng, M., Chen, Y., Xiao, W., Sun, R. & Tian, Z. NK cell-based immunotherapy for malignant diseases. *Cell Mol Immunol* **10**, 230–252 (2013).
3. Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T. & Ugolini, S. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* **9**, 503–510 (2008).
4. Fathman, J. W. *et al.* Identification of the earliest natural killer cell–committed progenitor in murine bone marrow. *Blood* **118**, 5439–5447 (2011).
5. Rosmaraki, E. E. *et al.* Identification of committed NK cell progenitors in adult murine bone marrow. *Eur J Immunol* **31**, 1900–1909 (2001).
6. Kim, S. *et al.* In vivo developmental stages in murine natural killer cell maturation. *Nat Immunol* **3**, 523–528 (2002).
7. Williams, N. S., Kubota, A., Bennett, M., Kumar, V. & Takei, F. Clonal analysis of NK cell development from bone marrow progenitors *in vitro*: orderly acquisition of receptor gene expression. *Eur J Immunol* **30**, 2074–2082 (2000).
8. Chiossone, L. *et al.* Maturation of mouse NK cells is a 4-stage developmental program. *Blood* **113**, 5488–5496 (2009).
9. Yu, J. *et al.* CD94 Defines Phenotypically and Functionally Distinct Mouse NK Cell Subsets. *J Immunol* **183**, 4968–4974 (2009).
10. Miyazaki, A. *et al.* Predominance of T lymphocytes in pancreatic islets and spleen of pre-diabetic non-obese diabetic (NOD) mice: a longitudinal study. *Clin Exp Immunol* **60**, 622–30 (1985).

11. MAKINO, S. *et al.* Breeding of a Non-Obese, Diabetic Strain of Mice. *Exp Anim Tokyo* **29**, 1–13 (1980).
12. Ogasawara, K. *et al.* Impairment of NK Cell Function by NKG2D Modulation in NOD Mice. *Immunity* **18**, 41–51 (2003).
13. Negishi, K. *et al.* Natural killer cell and islet killer cell activities in Type 1 (insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* **29**, 352–357 (1986).
14. Nair, M. P. N., Lewis, E. W. & Schwartz, S. A. Immunoregulatory dysfunctions in type I diabetes: Natural and antibody-dependent cellular cytotoxic activities. *J Clin Immunol* **6**, 363–372 (1986).
15. Kataoka, S. *et al.* Immunologic Aspects of the Nonobese Diabetic (NOD) Mouse: Abnormalities of Cellular Immunity. *Diabetes* **32**, 247–253 (1983).
16. Carnaud, C., Gombert, J.-M., Donnars, O., Garchon, H.-J. & Herbelin, A. Protection Against Diabetes and Improved NK/NKT Cell Performance in NOD.NK1.1 Mice Congenic at the NK Complex. *J Immunol* **166**, 2404–2411 (2001).
17. Collin, R. *et al.* An Unbiased Linkage Approach Reveals That the p53 Pathway Is Coupled to NK Cell Maturation. *J Immunol* **199**, 1490–1504 (2017).
18. Pelletier, A.-N., Guilbault, L., Guimont-Desrochers, F., Hillhouse, E. E. & Lesage, S. NK Cell Proportion and Number Are Influenced by Genetic Loci on Chromosomes 8, 9, and 17. *J Immunol* **196**, 2627–2636 (2016).
19. Rodacki, M., Milech, A. & Oliveira, J. E. P. de. NK Cells and Type 1 Diabetes. *Clin Dev Immunol* **13**, 101–107 (2006).
20. Kikutani, H. & Makino, S. The Murine Autoimmune Diabetes Model: NOD and Related Strains. *Adv Immunol* **51**, 285–322 (1992).

21. Raulet, D. H. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat Rev Immunol* **3**, 781–790 (2003).
22. Iguchi-Manaka, A. *et al.* Accelerated tumor growth in mice deficient in DNAM-1 receptor. *J Exp Medicine* **205**, 2959–2964 (2008).
23. Nabekura, T. *et al.* Costimulatory Molecule DNAM-1 Is Essential for Optimal Differentiation of Memory Natural Killer Cells during Mouse Cytomegalovirus Infection. *Immunity* **40**, 225–234 (2014).
24. Schmidt, W. *et al.* Transloading of tumor cells with foreign major histocompatibility complex class I peptide ligand: a novel general strategy for the generation of potent cancer vaccines. *Proc National Acad Sci* **93**, 9759–9763 (1996).
25. Mombaerts, P. *et al.* RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* **68**, 869–877 (1992).
26. Shinkai, Y. *et al.* RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* **68**, 855–867 (1992).
27. Meazza, R., Azzarone, B., Orengo, A. M. & Ferrini, S. Role of Common-Gamma Chain Cytokines in NK Cell Development and Function: Perspectives for Immunotherapy. *J Biomed Biotechnol* **2011**, 861920 (2011).
28. Hayakawa, Y. & Smyth, M. J. CD27 Dissects Mature NK Cells into Two Subsets with Distinct Responsiveness and Migratory Capacity. *J Immunol* **176**, 1517–1524 (2006).
29. Wendel, M., Galani, I. E., Suri-Payer, E. & Cerwenka, A. Natural Killer Cell Accumulation in Tumors Is Dependent on IFN- γ and CXCR3 Ligands. *Cancer Res* **68**, 8437–8445 (2008).
30. Ballas, Z. K., Buchta, C. M., Rosean, T. R., Heusel, J. W. & Shey, M. R. Role of NK Cell Subsets in Organ-Specific Murine Melanoma Metastasis. *Plos One* **8**, e65599 (2013).

31. Paul, S., Kulkarni, N. & Lal, G. Intratumoral natural killer cells show reduced effector and cytolytic properties and control the differentiation of effector Th1 cells. *Oncoimmunology* **5**, e1235106 (2016).
32. Shultz, L. D. *et al.* Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. *J Immunol Baltim Md 1950* **154**, 180–91 (1995).
33. Collin, R. *et al.* An Unbiased Linkage Approach Reveals That the p53 Pathway Is Coupled to NK Cell Maturation. *J Immunol* **199**, 1490–1504 (2017).
34. Brauner, H. *et al.* Distinct Phenotype and Function of NK Cells in the Pancreas of Nonobese Diabetic Mice. *J Immunol* **184**, 2272–2280 (2010).
35. Chin, Y. E. *et al.* Cell Growth Arrest and Induction of Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor p21WAF1/CIP1 Mediated by STAT1. *Science* **272**, 719–722 (1996).
36. Chawla-Sarkar, M. *et al.* Apoptosis and interferons: Role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis. *Apoptosis* **8**, 237–249 (2003).
37. Balkwill, F. Tumour necrosis factor and cancer. *Nat Rev Cancer* **9**, 361–371 (2009).
38. Jin, J. *et al.* CD11b–CD27– NK Cells Are Associated with the Progression of Lung Carcinoma. *Plos One* **8**, e61024 (2013).
39. Hayakawa, Y. *et al.* Early activation and interferon- γ production of tumor-infiltrating mature CD27^{high} natural killer cells. *Cancer Sci* **102**, 1967–1971 (2011).
40. Lakshmikanth, T. *et al.* 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 (2009).

3.12. Figures

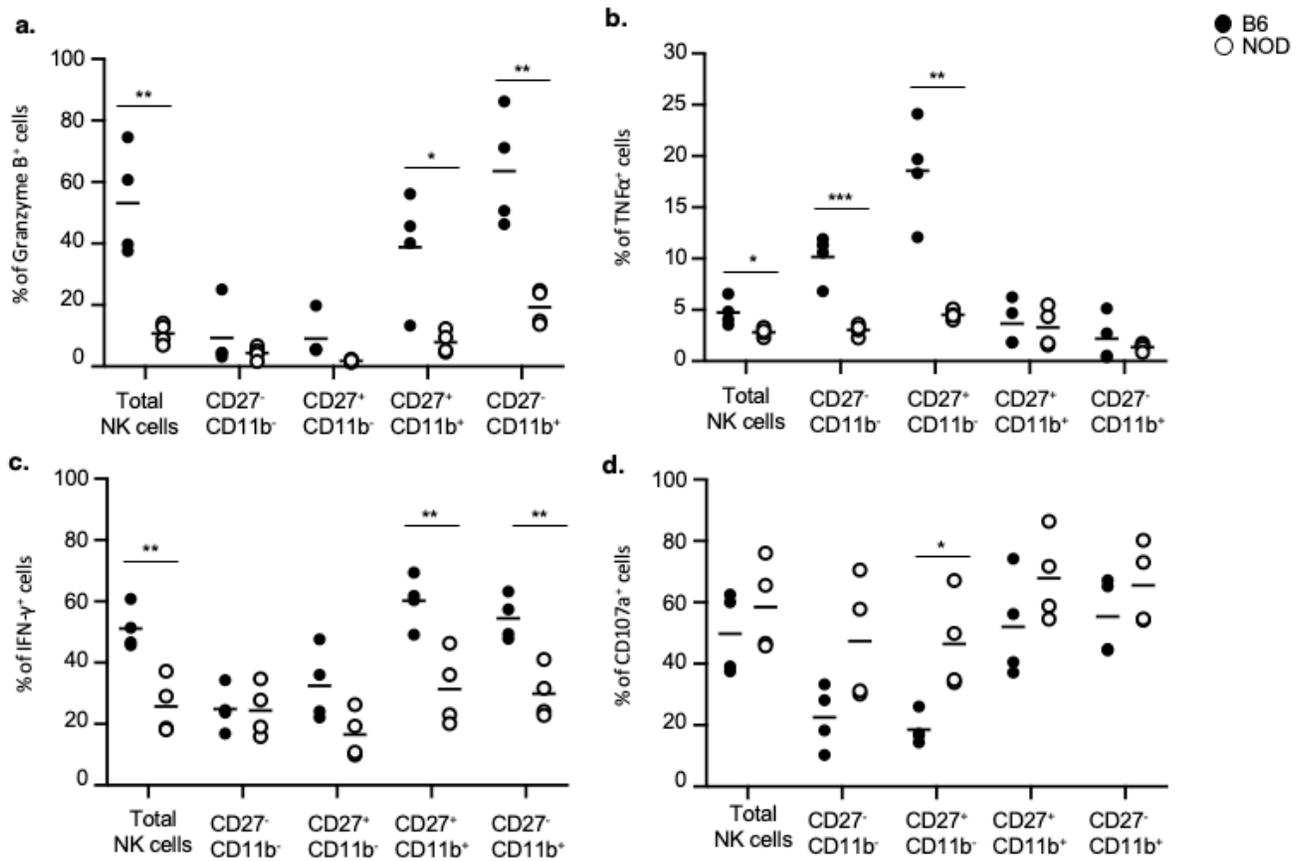


Figure 1. Expression of GzmB, TNF α , IFN- γ and CD107a in NOD and B6 NK cells. NK cells from spleens of NOD and B6 mice were enriched by magnetic separation then stimulated with PMA/ionomycin and BFA for 6 hours. The graphs represent the percentage of NK cells (CD3⁻CD19⁻NKp46⁺) positive for A) GzmB, B) TNF α , C) IFN- γ and D) CD107a in the total NK cell population and for each stage of functional maturation. $n \geq 3$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

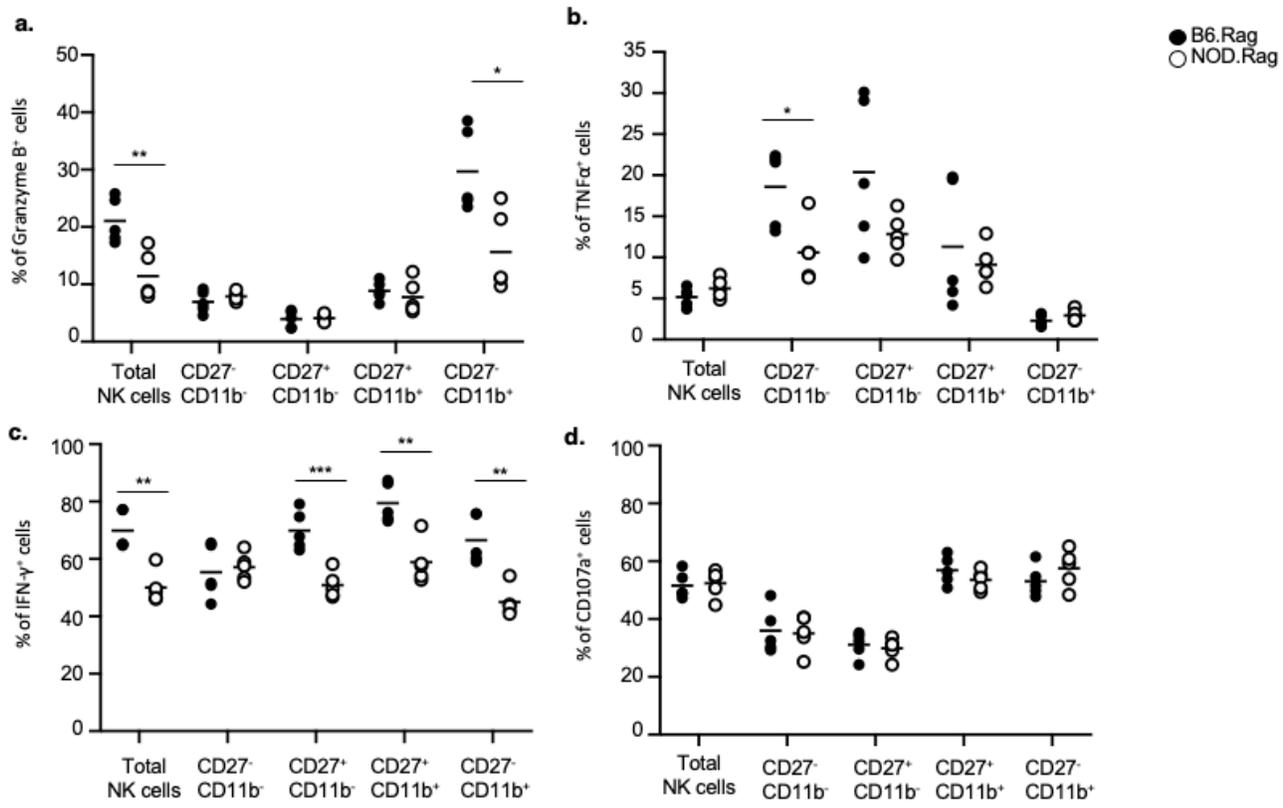


Figure 2. Expression of GzmB, TNFα, IFN-γ and CD107a in NOD.Rag and B6.Rag NK cells. The NK cells were obtained from spleens of NOD.Rag and B6.Rag mice by magnetic separation then stimulated with PMA/ionomycin and BFA for 6 hours. The graphs represent the percentage of NK cells (CD3⁻CD19⁻NKp46⁺) positive for, A) GzmB, B) TNFα, C) IFN-γ and D) CD107a in the total NK cell population and for each stage of functional maturation. n ≥ 3, * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001.

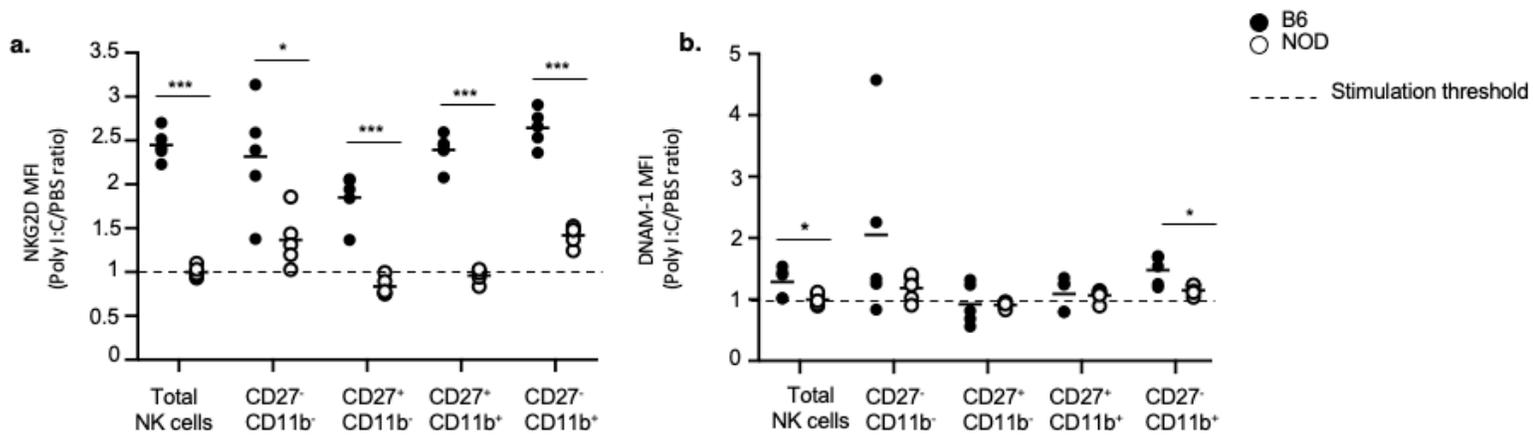


Figure 3. Expression of NKG2D and DNAM-1 in NOD and B6 NK cells. NOD and B6 mice were injected with Poly I: C or PBS 18 h prior to sacrificing them. The spleens were harvested, prepared and stained for NKG2D or DNAM-1. NK cell induction ($CD3^{-}CD19^{-}CD49b^{+}CD122^{+}$) for the total NK cell population and for each stage of functional maturation is represented with mean fluorescence intensity ratios comparing a cohort injected with Poly I:C and with PBS. The dotted lines represent an absence of response (expression ratio of 1). $n \geq 3$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

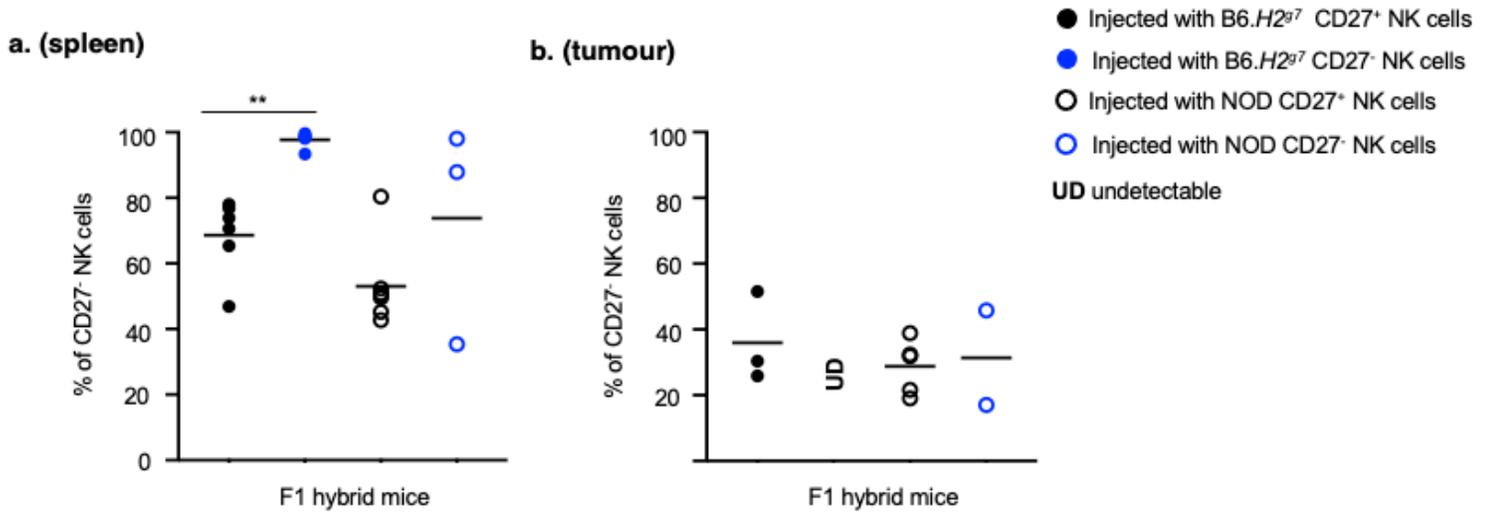


Figure 4. Proportion of CD27⁻ NK cells from B6.H2^{g7} and NOD backgrounds. After splenic NK-cell enrichment by magnetic separation, CD27⁺ and CD27⁻ NK cells were separated from B6.H2^{g7} and NOD mice by cell sorting and injected in F1 hybrids inoculated with B16F10 cells a week before. The proportion of CD27⁻ NK cells in the spleen (A.) and tumours (B.) of hybrid mice are depicted after two weeks of tumour growth. $n \geq 3$, ** $P < 0.01$. NK cells from sorted B6.H2^{g7} CD27⁻ cells were not detected (UT, $n = 5$). Only 2/3 mice had detectable NK cells in their tumour bed from sorted NOD CD27⁻ NK cells.

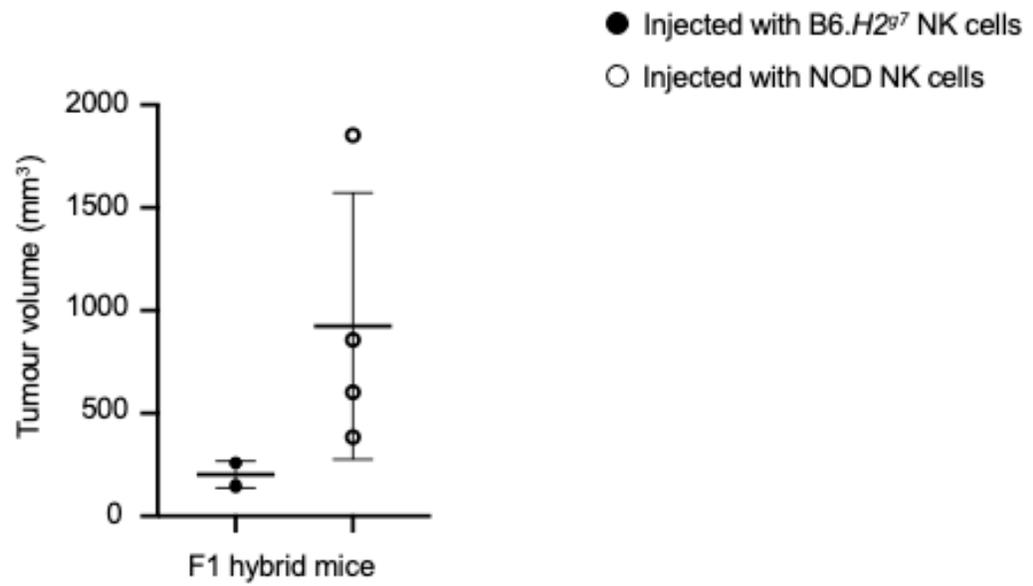


Figure 5. B16F10 tumour growth at 14 days. One week following B16F10-cell, splenic NOD and B6.H2^{g7} NK cells were magnetically separated and injected intravenously in F1 hybrid mice. After two weeks of growth, tumours were harvested. Mean tumour volume is represented in the graph. $n = 4$, $P = 0.06$.

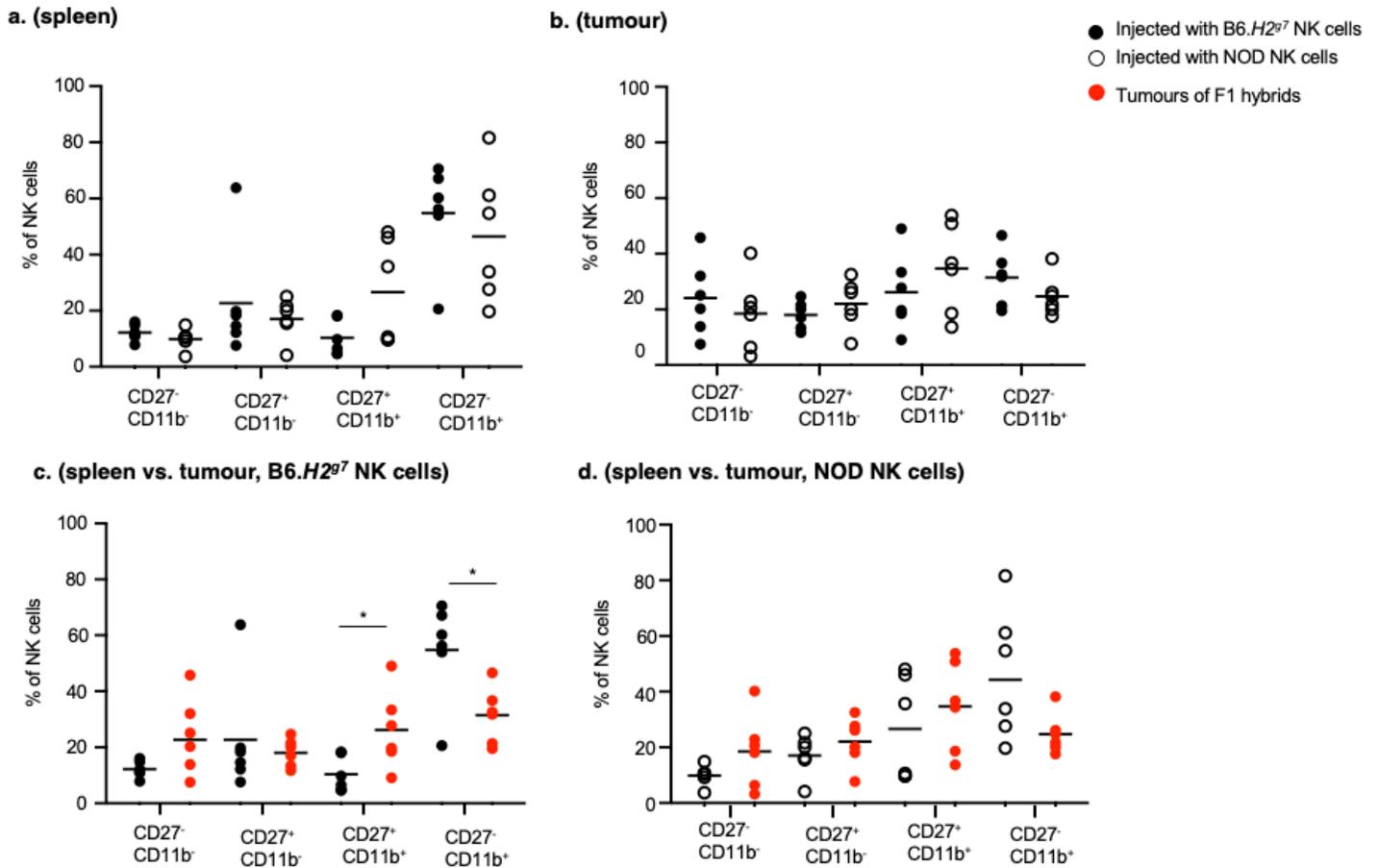


Figure 6. Proportion of NK cells throughout the four stages of functional maturation in spleens and tumours of F1 hybrid mice. Two weeks following B16F10 tumour growth, NK cells previously obtained by magnetic separation from either B6.H2^{g7} or NOD mice were injected in F1 hybrid mice. The splenic (A.) and tumour (B.) proportion of NK cells of every stage are compared between F1 hybrids injected with either B6.H2^{g7} or NOD NK cells. The proportion of NK cells is contrasted between the spleen and tumour of hybrids injected with B6.H2^{g7} (C.) and NOD (D.) NK cells. n = 6, * $P < 0.05$.

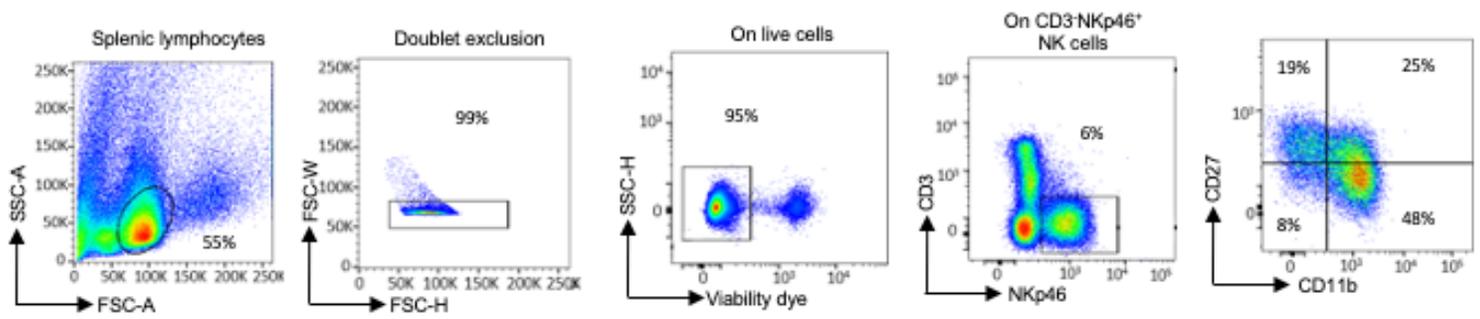


Figure S1. Gating strategy for splenic NK cells in B6 and NOD mice. NK cells are identified as CD3⁻NKp46⁺, which are further subdivided into 4 distinct stages with CD11b and CD27, reflecting the functional maturation of NK cells.

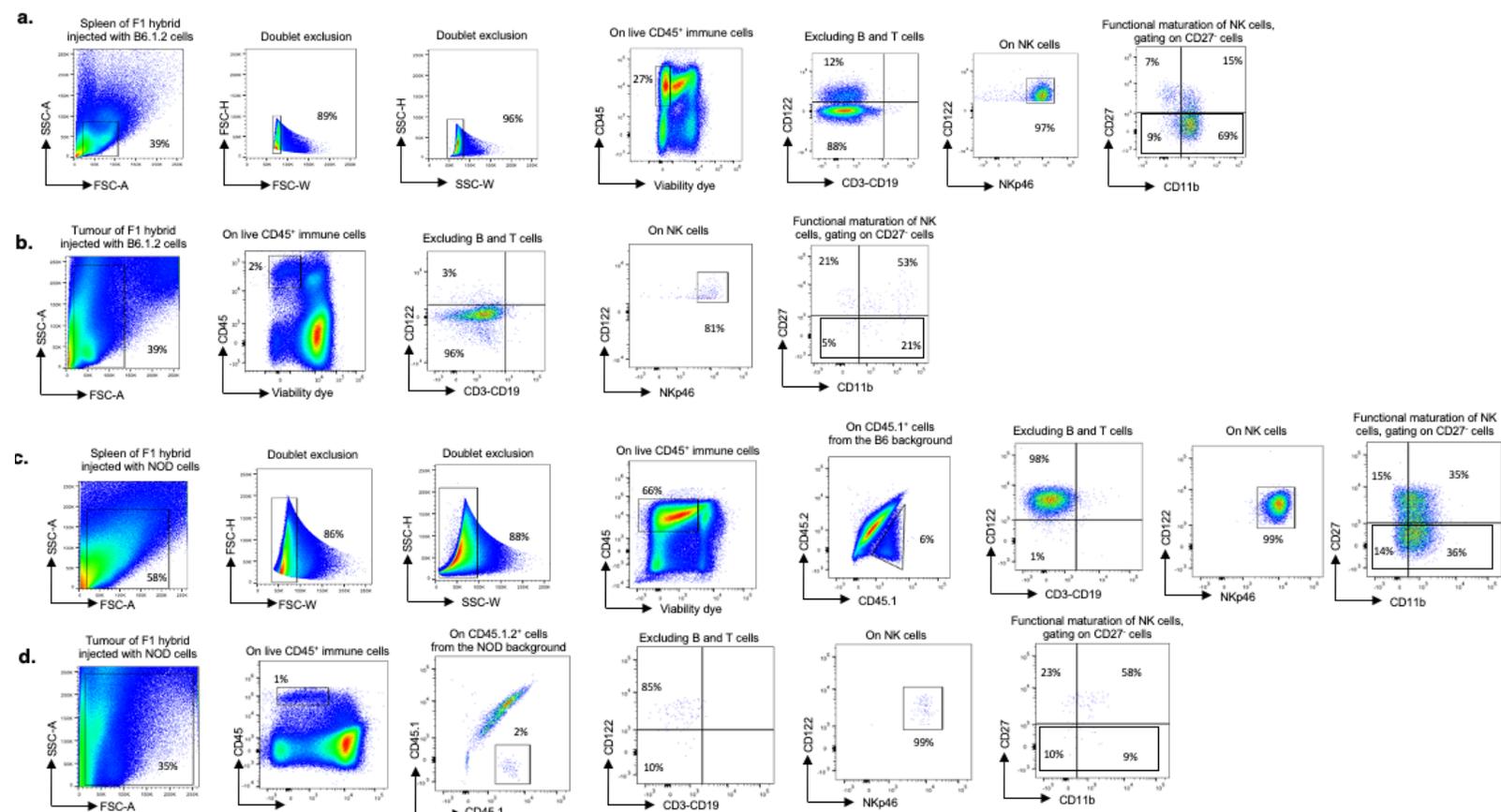


Figure S2. Gating strategies for total splenic NK cells from B6.1.2 (A.) and NOD (C.) mice in F1 hybrids with their corresponding tumours (B., D. respectively). F1 hybrid mice were injected with either CD27⁺ or CD27⁻ NK cells from spleens of B6.1.2 or NOD donor mice. The cells were identified as CD3⁻CD19⁻NKp46⁺CD122⁺ in the spleen. TINKs were identified as CD45⁺CD3⁻CD19⁻NKp46⁺CD122⁺. Functional maturation of NK cells was depicted with the expression of CD11b and CD27.

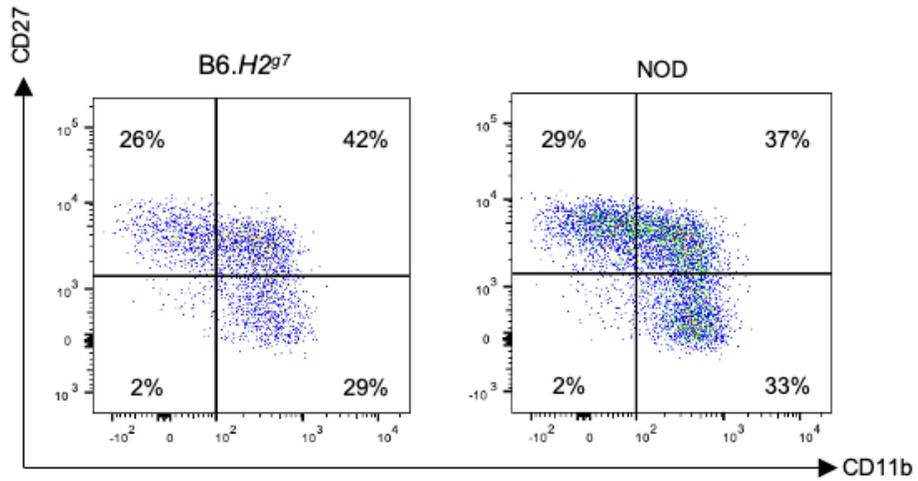


Figure S3. Functional maturation of splenic NK cells in B6.H2^{g7} (left) and NOD (right) mice. NK cells (CD3⁻CD19⁻NKp46⁺CD122⁺) were separated into four stages with the expression of CD11b and CD27.

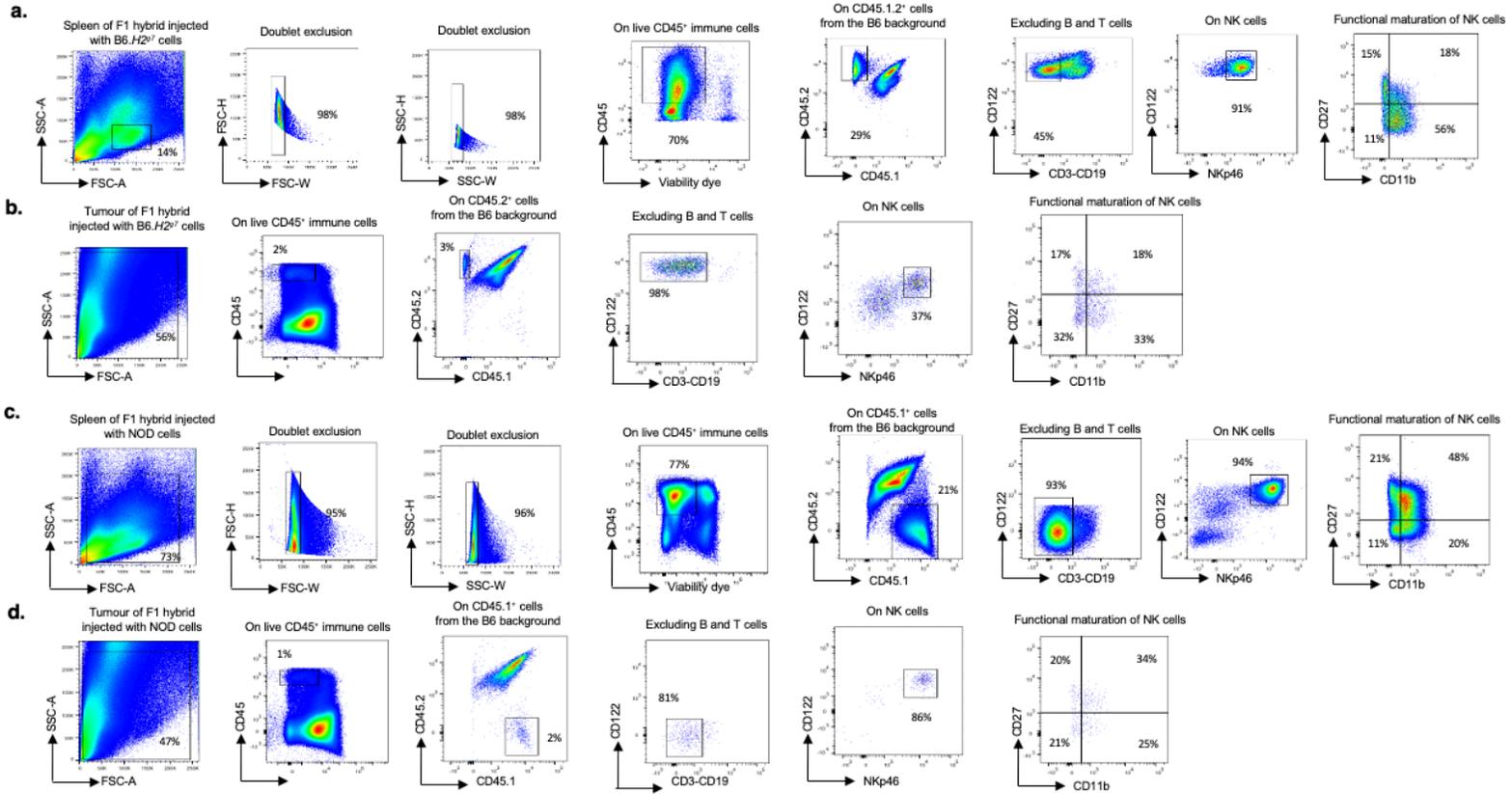


Figure S4. Gating strategies for total splenic NK cells from B6.H2^{g7} (A.) and NOD (C.) mice in F1 hybrids with their corresponding tumours (B., D. respectively). F1 hybrid mice were injected with either total splenic NK cells from either B6.H2^{g7} or NOD donor mice. The cells were identified as CD3⁻CD19⁻NKp46⁺CD122⁺ in the spleen. TINKs were identified as CD45⁺CD3⁻CD19⁻NKp46⁺CD122⁺. Functional maturation of NK cells was depicted with the expression of CD11b and CD27.

4. CHAPITRE 4 – DISCUSSION

Les cellules NK sont un sous-ensemble de lymphocytes du système immunitaire inné qui sont reconnues principalement pour leurs réponses anti-tumorales et anti-virales. Ce mémoire porte sur les cellules NK avec objectif principal de mieux comprendre l'influence du bagage génétique sur le phénotype et la fonction des cellules NK.

Tout d'abord, nous avons étudié le rôle du gène *Itgad* qui code pour la protéine CD11d sur les cellules NK. Les intégrines de la famille des intégrines $\beta 2$ (CD11a/CD18, CD11b/CD18, CD11c/CD18 et CD11d/CD18) régulent la signalisation cellulaire et facilitent l'adhésion cellulaire à la matrice extracellulaire. *Itgad* code pour CD11d, la dernière sous-unité alpha découverte d'abord chez l'humain. Nous avons évalué l'effet de l'absence de CD11d sur l'expression de CD11a, CD11b, CD11c et CD18 dans les cellules T, les cellules B, les monocytes, les cDCs, les pDCs et les cellules NK spléniques dans un modèle murin CD11d^{-/-} (CD11d-KO) en comparaison avec les souris B6. Nous avons démontré que l'effet de la délétion de CD11d sur l'expression des autres sous-unités d'intégrine est spécifique au type de cellule immunitaire. En effet, la diminution la plus notable de l'expression de CD11b et de CD11c était notée dans les cellules NK. Ceci nous a poussés à étudier de façon plus détaillée l'impact de l'absence de CD11d sur la biologie des cellules NK. D'abord, tant la proportion que le nombre absolu de cellules NK spléniques sont comparables entre les souris B6 et CD11d-KO. Après activation in vitro, les cellules NK des deux souches présentent des niveaux similaires de production d'IFN- γ et d'expression de CD69. Cependant, le marqueur de dégranulation, CD107a, est significativement réduit dans les cellules NK originant des souris CD11d-KO. Cela suggère donc que la perte de CD11d peut altérer l'activité cytotoxique des cellules NK. Pour déterminer si l'absence de CD11d affecte la fonction des cellules NK in vivo, nous avons injecté des cellules de mélanome murin (B16F10) dans des souris B6 et CD11d-KO. Bien que la croissance tumorale n'ait pas été affectée, une proportion accrue de cellules NK a été retracée dans le lit tumoral des souris CD11d-KO par rapport aux souris B6. Dans l'ensemble, cette étude met en lumière l'effet de CD11d sur l'expression d'autres sous-unités d'intégrine dans les cellules immunitaires et souligne le rôle potentiel d'*Itgad* dans la modulation des proportions de cellules NK intra-tumorales.

Ensuite, nous avons exploité les cellules NK de la souris NOD qui présentent des défauts fonctionnels significatifs que nous avons précédemment attribués à un défaut dans leur processus de maturation fonctionnelle. La mesure d'effecteurs cytotoxiques clés, soit l'IFN- γ , le TNF α et le GzmB, dans la souris NOD a indiqué qu'en plus d'une maturation fonctionnelle défectueuse, les cellules NK de la souris NOD ne parviennent pas à acquérir leurs fonctions effectrices par rapport aux cellules NK de la souris B6. Bien que nous ayons observé un potentiel de dégranulation similaire entre les deux souris, la production de GzmB par les cellules NK totales était significativement diminuée chez les souris NOD. Nous avons également pu montrer que les cellules NK de cette même souris sont incapables d'induire l'expression du récepteur d'activation NKG2D en réponse à un stimulus mimant une infection virale (poly I:C). Dans un modèle de mélanome murin similaire au premier projet, nous avons démontré que les cellules NK CD27⁺ provenant des souris NOD et B6 perdent l'expression du CD27 dans la rate, favorisant ainsi une augmentation des cellules NK CD11b⁺CD27⁻spléniques. Tout comme pour les cellules NK de la lignée B6, les cellules NK CD27⁺ de la souris NOD s'accumulent préférentiellement dans les tumeurs. Malgré un phénotype similaire dans la rate et le lit tumoral entre les deux lignées, nous avons démontré que les cellules NK de NOD ne parviennent pas à contrôler adéquatement la croissance tumorale contrairement à leurs homologues de B6. Ensemble, ces travaux ont contribué à l'avancement des connaissances sur les cellules NK. Dans ce chapitre, nous discuterons plus en détails des résultats obtenus dans les chapitres 2 et 3 en mentionnant des travaux de la littérature qui n'ont pas été abordés encore dans ce mémoire. Nous allons également considérer les limites des deux études et les perspectives futures.

4.1. Retour sur le rôle de CD11d dans la biologie des cellules NK et perspectives futures

Peu de données existent dans la littérature sur le rôle du gène *Itgad* sur les cellules immunitaires [167,180,183]. Puisque les intégrines sont exprimées à différents degrés dans les cellules T, les cellules B, les cellules NK, les monocytes, les cDC et les pDC, nous avons d'abord étudié le rôle de CD11d sur ces populations. Après avoir établi que l'absence de CD11d n'affecte pas les proportions spléniques et le nombre absolu de ces cellules immunitaires, nous avons démontré que l'expression de la sous-unité CD11d peut affecter celle de CD11a, CD11b, CD11c et CD18 à différents niveaux selon le type de cellule. De manière intéressante, la perte de CD11d affecte de manière très significative l'expression de CD11b et CD11c dans les cellules NK. Le mécanisme spécifique au type cellulaire influençant l'expression des intégrines de la famille $\beta 2$ reste à élucider. Il existe une explication possible à ces résultats. Tel que mentionné dans l'introduction de ce mémoire, la souris CD11d-KO a été générée en perturbant une région de 2,2 Kb contenant les exons 1 et 2 à l'aide d'un gène de résistance à la néomycine. Chez la souris, le gène *Itgad* codant pour CD11d est situé sur le 7^e chromosome et les gènes codant pour CD11b et CD11c, *Itgam* et *Itgax* respectivement, se situent près du gène *Itgad* (figure 12). Pour vérifier si la diminution de l'expression de CD11b et CD11c observée dans certaines populations immunitaires dont les cellules NK n'est pas causée par le modèle CD11d-KO lui-même, c'est-à-dire par la séquence du transgène, nous pourrions silencer le gène *Itgad* dans des souris B6 via les petits ARN en épingle à cheveux (*Short hairpin RNA*, shRNA). Un shRNA est une molécule d'ARN artificielle qui a une forme d'une épingle à cheveux qui peut être utilisée diminuer l'expression d'un gène cible en interférant avec son ARN [211]. Ainsi, l'effet est très spécifique à un gène en particulier et ne devrait donc pas affecter directement l'expression des gènes environnants. Nous avons tenté cette approche, sans succès. Les taux d'infections de cellules étaient trop faibles pour permettre l'interprétation des résultats. Il serait intéressant de reprendre ces expériences avec des vecteurs d'infections différents.

Néanmoins, nous croyons que l'effet de l'absence d'expression de CD11d sur la biologie des cellules NK dans la souris CD11d-KO est spécifique au rôle de CD11d. Bien qu'il y ait une possibilité que la diminution de CD11b et CD11c soit liée à la manière dont le modèle murin a été génétiquement modifié, nos résultats démontrent que l'absence de CD11d a un impact très spécifique sur le phénotype des cellules NK et leur comportement in vivo. D'ailleurs, si l'absence de CD11d affectait l'expression de CD11b et CD11c, on devrait observer une diminution de ces sous-unités dans toutes les cellules analysées; pourtant, ce n'était pas le cas.

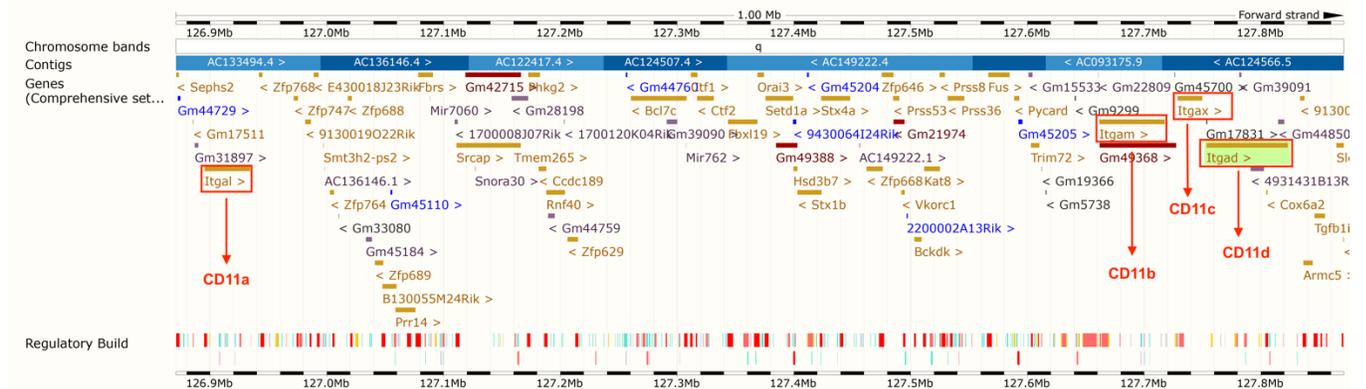


Figure 12. Localisation du gène *Itgad* par rapport aux gènes *Itgam*, *Itgax* et *Itgal*.

Les gènes *Itgad*, *Itgax*, *Itgam* et *Itgal* codent respectivement pour les sous-unités CD11d, CD11c, CD11b et CD11a. Chez la souris, ces gènes se retrouvent sur la région distale du chromosome 7. Il n'est pas exclu que l'introduction d'une séquence génétique dans le gène *Itgad* ait affecté l'expression protéique de CD11c et CD11b par leur localisation. Le gène *Itgb2* codant pour CD18 et est quant à lui situé sur le chromosome 10 et donc on ne le voit pas sur cette figure. Cette figure a été tirée et adaptée de e!Ensembl [212].

Une autre façon d'étudier le rôle de CD11d sur les cellules NK consisterait à bloquer son ligand VCAM-1 et/ou ICAM-3, les deux seuls connus chez la souris [152,183]. Les souris déficientes en VCAM-1 ont des défauts d'organogénèse sévères et un développement défectueux des systèmes circulatoires embryonnaires et extra-embryonnaires [213,214]. Il est par contre possible de supprimer le gène de VCAM-1 par la création de souris transgéniques adultes avec le système Cre recombinase/loxP, permettant de surmonter la létalité embryonnaire [215]. Chez l'homme, l'intégrine CD11d/CD18 interagit avec ICAM-3 sur les neutrophiles, permettant la potentialisation de la production d'IFN- γ [183]. L'exploitation de cet axe pourrait nous informer davantage sur le

rôle de cette intégrine à titre d'intermédiaire entre les systèmes immunitaires innés et adaptatives et sur l'expression d'autres sous-unités d'intégrines. Finalement, des études de reconstitution pourraient être effectuées (*knock-in* CD11d) dans le but de vérifier si les phénotypes dysfonctionnels des cellules NK peuvent être récupérés.

L'expression de l'IFN- γ et de CD69 était similaire entre les lignées B6 et CD11d-KO, ce qui suggère une production d'IFN- γ in vitro et un potentiel d'activation similaires malgré l'absence de CD11d et, dans une moindre mesure, de CD11b et CD11c. Dans une étude menée par le groupe Ugolini, les cellules NK spléniques murines qui n'expriment pas les intégrines de la famille $\beta 2$ avaient une production d'IFN- γ préservée dans le contexte d'une infection précoce par le MCMV [167]. Par contre, le même groupe a démontré dans la même étude que les niveaux d'expression d'IFN- γ par les cellules NK étaient diminués dans les souris *Itgb2*^{-/-} par rapport aux souris B6 lorsque stimulées in vitro par des anticorps ciblant les récepteurs activateurs NK1.1, NKp46 et Ly49D. Ces résultats suggèrent que les intégrines $\beta 2$ ont un impact sur la fonction des cellules NK, mais que cette déficience peut être contournée lors d'une infection au MCMV. Les résultats contradictoires avec notre étude peuvent possiblement s'expliquer par le fait que la souris CD11d-KO cible spécifiquement le gène *Itgad* plutôt que le gène *Itgb2*. Compte tenu de l'importance des intégrines $\beta 2$ pour l'établissement d'un contact entre deux cellules, lorsqu'elles sont absentes, les hétérodimères CD11a/CD18, CD11b/CD18, CD11c/CD18 et CD11d/CD18 ne peuvent pas se former, ce qui peut avoir un impact majeur sur les cellules NK et se refléter ainsi sur leur fonction.

Nous avons noté que l'expression de CD107a sur les cellules NK de la souris CD11d-KO était diminuée par rapport à la souris B6. Ceci suggère une plus faible dégranulation, ce qui peut avoir un impact direct sur la fonction des cellules NK. Il a déjà été démontré que l'expression de CD107a corrèle à la sécrétion de cytokines et à la lyse des cellules cibles par les cellules NK. Par contre, ce marqueur est également exprimé par des cellules NK qui ne sécrètent pas de cytokine après leur stimulation [93]. Ainsi, même si CD107a représente un marqueur de l'activité fonctionnelle des cellules NK, il n'est pas suffisant seul pour tirer des conclusions sur leurs fonctions. Afin de bonifier nos trouvailles, il serait possible de mesurer l'expression de granules lytiques, comme la perforine et les granzymes B, qui induisent l'apoptose de cellules cibles. Nous avons également démontré que l'expression d'IFN- γ est similaire entre les deux lignées murines. La mesure de la cytokine

TNF- α par les cellules NK peut être également faite. Il est à noter par contre que les cellules NK ne produisent pas autant de TNF- α que d'IFN- γ , ce qui peut être plus difficile à quantifier. Il serait aussi possible d'effectuer des tests de cytotoxicité in vitro. En bref, cette procédure consisterait à marquer des cellules sensibles à la cytotoxicité cellulaire médiée par les cellules NK tels que K-562 et YAC-1 avec du Chrome-51 (^{51}Cr). Ces cellules seront par la suite incubées avec des cellules NK de B6 et de CD11d-KO séparément. Finalement, on précèdera à la mesure de relâche du ^{51}Cr par des cellules cibles lysées par les cellules NK. [216].

On peut noter qu'il existe une grande variabilité dans la croissance tumorale dans le projet portant sur CD11d, et ce, malgré le respect du protocole d'une expérience à une autre. La variabilité inter-expérimentale est inhérente aux essais in vivo pour différentes raisons. Elles s'effectuent sur plusieurs semaines et il est possible de commettre des erreurs par inadvertance à n'importe quelle étape de l'expérience. Par exemple, les conditions de culture cellulaire doivent rester identiques d'un repassage cellulaire à un autre.

De manière intéressante, malgré la variabilité de taille des tumeurs, les souris CD11d-KO ont une plus grande proportion de cellules NK dans leurs tumeurs. Bien que les intégrines contribuent à l'attachement de cellules immunitaires à la matrice extracellulaire, leurs délétions peut donner des résultats variables selon le type d'intégrine et le contexte dans lequel cette délétion est testée. Par exemple, d'une part, l'infiltration tumorale des macrophages est diminuée chez les souris *Itgb3*^{-/-} (déficientes en intégrine $\alpha\beta3$) et contribue à l'augmentation de la charge tumorale dans un modèle de mélanome et de cancer colorectal, ce qui démontre que l'expression de l'intégrine $\alpha\beta3$ sur les macrophages est importante pour leur suppression tumorale [217]. D'autre part, la délétion de *Itgb2*^{-/-} mène à l'état neutre (i.e. sans contexte pathologique) à l'augmentation de la proportion de cellules NK dans la rate, le foie et la moelle osseuse [167]. Les souris *CD11a*^{-/-} ne réussissent pas à induire une infiltration lymphocytaire et une clairance tumorale dans un modèle de fibrosarcome murin [218]. L'augmentation du nombre de cellules NK dans le lit tumoral des souris CD11d-KO peut s'expliquer par une diminution de la mort des cellules NK, une augmentation de la prolifération intra-tumorale, une augmentation de l'entrée ou une diminution de la sortie de cellules de la tumeur. Comme les intégrines ont la capacité de se lier à de nombreux ligands [219]. Il est possible que la perturbation de CD11d/CD18 ait mené

à un répertoire différent de liaison aux ligands favorisant la migration des cellules NK de la rate et de la circulation vers la tumeur. Plusieurs études suggèrent que cette intégrine pourrait être différente dans la médiation de la migration et de la réponse des leucocytes dans des contextes inflammatoires [174,220–222].

Les cellules NK de la souris CD11d-KO sont plus abondantes dans les tumeurs par rapport aux souris B6 malgré une croissance tumorale similaire. Ceci suggère que la fonction des cellules NK chez les souris CD11d-KO est altérée dans la tumeur, étant incapable de limiter la croissance tumorale même lorsqu'elles sont présentes en plus grand nombre. Il est possible que la diminution de l'expression de CD107a dans les cellules NK de la souris CD11d-KO ait entraîné une destruction moins efficace des cellules tumorales in vivo. Pour y parvenir, il faudra d'abord isoler les cellules infiltrantes par tri cellulaire, puis marquer leurs protéines effectrices, et les analyser par cytométrie. Étant déjà fragilisées par le microenvironnement tumoral [223,224], la caractérisation fonctionnelle des cellules NK intra-tumorales représente un défi technique important, mais pas insurmontable.

Tel que mentionné précédemment dans ce mémoire, l'infiltration intra-tumorale des cellules NK dans des tumeurs solides corrèle favorablement avec le pronostic oncologique. Par contre, il est difficile d'étudier le rôle de cellules NK dans les tumeurs solides. Plusieurs éléments freinent le potentiel anti-tumoral de ces cellules NK dans le microenvironnement tumoral. Par exemple, elles sont confrontées à un milieu immunosuppresseur induit par des fibroblastes, des cellules stromales, des cellules myéloïdes et des cellules T régulatrices qui modulent le profil transcriptionnel et métabolique des cellules NK par la production de cytokines et de facteurs solubles [225]. Comme avec les cellules T, l'épuisement fonctionnel des cellules NK est prévalent dans la tumeur et peut être atteint par une forte expression tumorale de ligands de points de contrôle (*checkpoint ligands*) comme PD-1, TIM-3, CD96 et NKG2A chez l'humain et TIGIT chez l'humain et la souris [225,226]. Le phénotype épuisé de cellules NK produit moins d'IFN- γ , de GzmB, de perforine, diminue l'expression de NKG2D tout en augmentant le récepteur inhibiteur NKG2A [227]. La fonction in vivo de cellules NK activées dépend d'ailleurs grandement de cytokines circulantes comme IL-2 et IL-15. Sans cytokines, les cellules NK sont moins capables de localiser les tumeurs, de se proliférer et d'induire la lyse tumorale [223]. Des facteurs attribués

au lit tumoral affectent également l'infiltration des cellules NK, telles que la composition de la matrice extracellulaire et la densité de la vascularisation des tumeurs solides [228].

Une autre raison pouvant expliquer une croissance tumorale similaire entre les souris B6 et CD11d-KO malgré une plus grande proportion de cellules NK dans la souris KO est reliée aux cellules T. Les cellules NK représentent en moyenne environ 10% de l'infiltrat tumoral (figure 6D du premier article, chapitre 2). Le reste de l'infiltrat est constitué principalement de LT. Ainsi, les LT ont également contribué à freiner la croissance tumorale. On ne peut donc pas conclure sur la fonction anti-tumorale in vivo des cellules NK de la souris CD11d-KO.

Pour résoudre le problème rencontré avec le modèle de mélanome B16 où les cellules NK et LT contribuent à la destruction tumorale, nous prévoyons prochainement répéter la même expérience avec la lignée cellulaire de lymphome murin RMA-S. Cette lignée n'exprime pas le CMH-I à la surface des cellules en raison d'un défaut de TAP-2, une protéine nécessaire à la formation du complexe TAP (*transporter associated with antigen processing*) [229]. Les cellules NK ne nécessitent pas de reconnaissance antigénique pour appliquer leurs fonctions contrairement aux LT. Ainsi, la lignée RMA-S est un excellent modèle pour l'étude de la fonction anti-tumorale des cellules NK puis qu'elle n'exprime pas le MHC-I et est donc uniquement sensible à la cytotoxicité des cellules NK [230]. Le maintien de cette lignée en culture est par contre plus difficile qu'avec la lignée B16. De plus, les cellules RMA-S s'injectent également en sous-cutané, mais l'obtention d'une tumeur visible n'est pas aussi rapide et facile qu'avec les cellules B16. Malgré tout, l'utilisation des cellules RMA-S est la prochaine étape logique de l'étude sur CD11d et est ainsi un incontournable pour évaluer la fonction in vivo des cellules NK.

Enfin, afin de tester réellement le potentiel migratoire et infiltratif des cellules NK entre la lignée B6 et CD11d-KO, nous pouvons effectuer des expériences avec des chimères. Plus précisément, des souris du fond génétique de B6 peuvent d'abord être irradiées à une dose létale. Les souris peuvent ensuite être injectées avec des cellules provenant de la moelle osseuse de souris B6.SJL (exprimant l'allèle CD45.1) et CD11d-KO, à un ratio de 1 :1. Ainsi, nous pouvons créer des chimères où les cellules d'une lignée entrent en compétition avec les cellules de l'autre lignée pour attaquer la tumeur. Suite à la reconstitution, des cellules tumorales peuvent ensuite être

injectées tel qu'effectuée lors des expériences précédentes. Bien que le potentiel anti-tumoral ne puisse être comparé entre les cellules, d'autres paramètres peuvent être tirées des chimères telles que la survie en circulation sanguine, la reconstitution dans les organes lymphoïdes primaires et secondaires et l'accumulation intra-tumorale.

4.2. Retour sur les cellules NK de NOD et perspectives futures

Dans le deuxième projet, nous avons identifié des défauts fonctionnels dans la souris NOD pour chaque stade de la maturation fonctionnelle. Les mécanismes qui expliquent ces différences ne sont pas bien élucidés encore. Quelques hypothèses méritent d'être mentionnées. Tout d'abord, nous avons observé une diminution drastique des niveaux de GzmB des cellules NK des souris NOD par rapport aux cellules NK de la souris B6. Les fonctions effectrices des cellules NK sont influencées par de nombreux facteurs de transcription. Par exemple, il a été démontré que T-bet est associé à une augmentation de GzmB et de perforines [57]. Ensuite, *Forkhead box protein O1* (FOXO1) a été proposé comme régulateur négatif de la cytotoxicité des cellules NK. Ex vivo, les cellules NK murines déficientes en FOXO1 démontrent un potentiel cytotoxique accru contre la lignée de lymphome murin Yac-1. Or, les cellules NK de la souris NOD sont connues d'avoir une plus faible cytotoxicité contre cette lignée néoplasique [195,196]. L'ablation de FOXO1 corrèle avec un meilleur contrôle tumoral des cellules NK dans un modèle de métastases pulmonaires de la lignée cellulaire de mélanome murin B16F10 [60]. Finalement, les cellules NK dont le facteur de transcription *myeloid elf-1-like factor* (MEF) est absent ont une production d'IFN- γ sévèrement affectée [62]. À la lumière de la baisse de GzmB et d'IFN- γ par les cellules NK de la souris NOD et du moins bon contrôle tumoral par rapport aux cellules NK de B6, il serait intéressant de comparer l'expression de T-bet, FOXO1 et de MEF entre les deux lignées murines.

Les cellules NK nécessitent une signalisation via la sous-unité γ_c des cytokines. Le nombre de cellules NK dans les souris dépourvues de la chaîne γ_c ($\gamma_c^{-/-}$) est extrêmement réduit et leurs fonctions sont très altérées [65,66]. La dysfonction des cellules NK de la souris NOD notés dans notre étude peuvent s'expliquer en partie par des défauts reliés aux cytokines. Il existe

d'innombrables preuves appuyant le rôle déterminant de l'IL-15 dans le développement et la fonction des cellules NK. En effet, l'IL-15 sert de médiateur au développement des cellules NK à partir de précurseurs de cellules NK engagés, favorise la différenciation des cellules NK immatures et soutient la survie des cellules NK matures dans les organes lymphoïdes périphériques [74–76]. Suwanai et al. avaient démontré qu'un allèle IL-15 est défectueux dans la souris NOD par rapport à B6g7 et que l'injection d'IL-15 complexée avec le récepteur IL15R α Fc dans les souris NOD améliore la cytotoxicité de leurs cellules NK [206]. Par ailleurs, le traitement in vitro des cellules NK de NOD avec l'IL-12 et l'IL-18 restaure capacité à produire de l'IFN- γ [198]. Ainsi, les défauts de cytokines notés dans la souris NOD peuvent en partie justifier les différences fonctionnelles entre NOD et B6.

Il est important de noter que dans notre étude les cellules NK ont été stimulées par la PMA/ionomycine qui peut rapidement induire la sécrétion de cytokines en activant directement la protéine kinase C ainsi qu'en augmentant la concentration de calcium intracellulaire, contournant ainsi l'activation médiée par les récepteurs de surface [231]. Il serait intéressant de comparer la production d'effecteurs entre les cellules NK de la souris B6 et NOD dans d'autres contextes comme par la mesure du ^{51}Cr dans des essais de cytotoxicité in vitro.

La partie in vivo de cette étude comporte quelques limites. Tout d'abord, il est difficile d'obtenir un nombre adéquat de cellules NK CD27 $^{+}$ et CD27 $^{-}$ à injecter après leur enrichissement par des billes magnétiques suivi d'un tri cellulaire. En effet, dans nos expériences, le nombre de cellules injectées dans une souris a varié entre 125 000 et de 670 000 cellules après un tri moyen de trois rates de NOD et trois de B6. Afin d'obtenir plus de cellules NK triés, il faudrait trier plus de rates, ce qui peut être techniquement long.

Il est à noter que dans une expérience comparant les cellules NK CD27 $^{+}$ et CD27 $^{-}$, l'analyse des cellules spléniques a révélé que lors du transfert de cellules NK CD27 $^{-}$ de NOD dans des souris hybrides F1, la proportion de cellules NK CD27 $^{-}$ était relativement faible, ce qui suggère que les cellules transférées ont acquis l'expression de CD27 dans la rate (Fig. 4a). Ceci est cependant très probablement dû à une contamination lors du tri cellulaire, car les cellules NK sont connues de passer du phénotype CD27 $^{+}$ au phénotype CD27 $^{-}$, alors que le contraire est hautement

improbable [25]. Une autre hypothèse serait que la mortalité des cellules transférées était relativement élevée, expliquant le faible nombre de cellules CD27⁺.

Nous avons généré une lignée F1 exprimant les deux haplotypes de B6 et de NOD (H-2b X H-2g7 respectivement) en croisant des souris Rag.IL2g et NRG et permettant ainsi la prise de greffe de cellules B16 qui sont dérivées du bagage génétique de la souris B6. Cet hybride est dépourvu de tout système immunitaire adaptatif, le rendant immunosupprimée, ce qui permet l'étude des cellules NK provenant de souris donneuses mais aussi de greffer d'autres lignées tumorales. Les trouvailles avec les tumeurs B16 auraient pu être spécifiques à cette lignée tumorale. Ainsi, pour mieux étudier le potentiel anti-tumoral des cellules NK de NOD et B6 et de corroborer nos résultats, il serait intéressant de répéter les expériences sur d'autres cellules tumorales telles que RMA-S (lymphome murin) et MC38 (adénocarcinome colique murin). Finalement, l'inflammation est un facteur de risque pour développer des cancers, mais peut également être protectrice. Par exemple, Dooley et al. ont démontré que le fond génétique de la souris NOD retarde l'apparition et la croissance des tumeurs pancréatiques et ralentit considérablement le taux de croissance des tumeurs après leur développement [232]. C'est pourquoi il serait pertinent de comparer la croissance tumorale de souris injectées avec des cellules NK de B6.Rag et de NOD.Rag afin d'éliminer la composante inflammatoire qu'on retrouve chez les souris NOD.

Certains défauts fonctionnels des cellules NK observés chez les souris NOD ont également été décrits chez les humains atteints de diabète de type I. Cependant, aucune étude humaine n'a étudié la maturation fonctionnelle des cellules NK chez des patients diabétiques. Il serait intéressant de vérifier si les trouvailles humaines correspondent aux trouvailles murines.

Ce mémoire porte sur l'influence du bagage génétique sur le phénotype et la fonction des cellules NK en contexte physiologique et pathologique, principalement néoplasique. Les cellules NK sont très hétérogènes au sein même d'un individu et peuvent varier dans leurs nombres, leurs proportions, leur répertoire de récepteurs activateurs et inhibiteurs ainsi que dans leurs fonctions. Ainsi, chaque sous-type de cellule NK a un rôle particulier avec un potentiel de production de cytokines et de cytolyse variable. Des évidences humaines et murines ont démontré que les cellules NK peuvent se développer en dehors de la moelle osseuse comme dans

les ganglions lymphatiques et le thymus respectivement avec des rôles biologiques uniques [233]. Plusieurs mécanismes régulés par les gènes contribuent à cette hétérogénéité. Une meilleure compréhension de l'influence des variations génétiques entre chaque individu sur les cellules NK est donc nécessaire.

Même si ce mémoire porte sur la caractérisation phénotypique et fonctionnelle des cellules NK chez la souris, les travaux présentés demeurent pertinents en clinique. D'abord, la protéine CD11d est présente chez l'humain [178,234] et la modulation de son expression pourrait représenter une cible thérapeutique intéressante pour augmenter l'infiltration intra-tumorale par les cellules NK. De plus, chez l'humain, en plus de leur subdivision selon l'expression de CD56 et CD16 [33], les cellules NK peuvent également être classées selon l'expression de CD11b et CD27 [235,236]. Comme chez la souris, les cellules NK CD27⁻CD11b⁻ humaines présentent un phénotype relativement immature alors que les cellules CD27⁺CD11b⁻ et CD27⁺CD11b⁺ produisent le plus de cytokines. Finalement, le phénotype CD11b⁺CD27⁻ est le plus cytotoxique [235]. Plus d'études sont nécessaires pour confirmer que ces sous-types humains représentent bel et bien l'équivalent murin. Ceci nous guiderait pour sélectionner des cellules NK à potentiel surtout cytotoxique qu'on pourrait utiliser comme thérapie cellulaire anti-cancéreuse chez l'humain.

Des difficultés éthiques et techniques limitent notre compréhension du développement des cellules NK chez l'homme. C'est pour cela que des souris dites humanisées, comme des souris immunodéficientes greffées de cellules humaines, constituent un moyen robuste et accessible de disséquer davantage le développement des cellules NK humaines [233].

4.3. Conclusion

L'objectif de ce mémoire consistait à étudier l'influence de la génétique sur le phénotype et la fonction des cellules NK dans un contexte physiologique puis néoplasique. Pour y arriver, nous avons d'abord étudié le rôle de CD11d sur la biologie des cellules NK. Nous avons noté que la perte de l'expression de CD11d n'affecte pas la proportion et le nombre absolu des cellules T, des cellules B, des cellules NK, des monocytes, des cDC et des pDC. Cette perte par contre affecte l'expression des sous-unités d'intégrine CD11a, CD11b, CD11c et CD18 de manière spécifique au type de cellule immunitaire. La diminution de l'expression de CD11b et CD11c était notée surtout dans les cellules NK des souris CD11d-KO qui présentaient également une diminution du marqueur de dégranulation CD107a lors de la stimulation in vitro. Les cellules NK des souris CD11d-KO étaient par contre présentes dans des proportions plus élevées dans les tumeurs que les cellules NK provenant des souris B6.

Par la suite, nous avons comparé les fonctions des cellules NK entre la souris B6 et NOD. Cette dernière est connue d'avoir plusieurs défauts immunitaires. Nous avons démontré que les cellules NK de NOD ne réussissent pas à produire adéquatement des facteurs cytotoxiques clés, à savoir l'IFN- γ , le TNF α et le GzmB, pour chaque étape de maturation fonctionnelle. Elles n'induisent par ailleurs pas l'expression du marqueur d'activation NKG2D suite à leur stimulation. Nous avons aussi démontré que les cellules NK CD27⁺ des backgrounds NOD et B6 perdent l'expression du CD27 dans la rate, favorisant une augmentation des cellules NK CD11b⁺CD27⁻. À l'inverse, ce sont surtout des cellules NK CD27⁺ des deux lignées qui s'accumulent préférentiellement dans les tumeurs B16. Enfin, les cellules NK transférées de NOD ne parviennent pas à contrôler adéquatement la croissance tumorale, contrairement à leurs homologues B6, malgré un phénotype similaire dans la rate et le lit tumoral.

Les résultats présentés dans ce mémoire clarifient davantage l'influence de la génétique sur la biologie des cellules NK. Une compréhension plus complète de la sous-unité CD11d et de l'intégrine CD11d/CD18 dans les cellules NK murines et éventuellement humaines est justifiée et pourrait potentiellement avoir des implications thérapeutiques dans le traitement du cancer. De

plus, les suites logiques à ces travaux seraient d'étudier les cellules NK chez des patients prédisposés à des maladies auto-immunes comme le diabète (en analogie à la souris NOD), ce qui pourrait nous offrir une meilleure compréhension des altérations du rôle anti-tumoral des cellules NK et des mécanismes immunitaires favorisant le développement de cancers chez ces patients. Les découvertes qui en découleraient permettraient de cibler les défauts immunitaires et peut-être de les renverser.

Références bibliographiques

1. Collin R, St-Pierre C, Guilbault L, Mullins-Dansereau V, Policheni A, Guimont-Desrochers F, et al. An Unbiased Linkage Approach Reveals That the p53 Pathway Is Coupled to NK Cell Maturation. *J Immunol.* 2017;199(4):1490–504.
2. Andrade CF, Waddell TK, Keshavjee S, Liu M. Innate Immunity and Organ Transplantation: The Potential Role of Toll-like Receptors. *Am J Transplant.* 2005;5(5):969–75.
3. Finn OJ. Immuno-oncology: understanding the function and dysfunction of the immune system in cancer. *Ann Oncol.* 2012;23(suppl_8):viii6–9.
4. Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. *Lancet.* 2001;357(9270):1777–89.
5. Hoebe K, Janssen E, Beutler B. The interface between innate and adaptive immunity. *Nat Immunol.* 2004;5(10):971–4.
6. Spadoni I, Zagato E, Bertocchi A, Paolinelli R, Hot E, Sabatino AD, et al. A gut-vascular barrier controls the systemic dissemination of bacteria. *Science.* 2015;350(6262):830–4.
7. Vivier E, Artis D, Colonna M, Diefenbach A, Santo JPD, Eberl G, et al. Innate Lymphoid Cells: 10 Years On. *Cell.* 2018;174(5):1054–66.
8. Round JL, Mazmanian SK. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(5):313–23.
9. Beutler B. Innate immunity: an overview. *Mol Immunol.* 2004;40(12):845–59.
10. Takeuchi O, Akira S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell.* 2010;140(6):805–20.
11. Eberl G, Colonna M, Santo JPD, McKenzie ANJ. Innate lymphoid cells: A new paradigm in immunology. *Science.* 2015;348(6237):aaa6566.
12. Chiossone L, Dumas P-Y, Vienne M, Vivier E. Natural killer cells and other innate lymphoid cells in cancer. *Nat Rev Immunol.* 2018;18(11):671–88.
13. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell.* 2006;124(4):783–801.

14. Mahla RS, Reddy MC, Prasad DVR, Kumar H. Sweeten PAMPs: Role of Sugar Complexed PAMPs in Innate Immunity and Vaccine Biology. *Front Immunol.* 2013;4:248.
15. Klune JR, Dhupar R, Cardinal J, Billiar TR, Tsung A. HMGB1: Endogenous Danger Signaling. *Mol Med.* 2008;14(7–8):476–84.
16. Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature.* 2002;418(6894):191–5.
17. Kiessling R, Klein E, Pross H, Wigzell H. „Natural” killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Eur J Immunol.* 1975;5(2):117–21.
18. Kiessling R, Klein E, Wigzell H. „Natural” killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur J Immunol.* 1975;5(2):112–7.
19. Kondo M, Weissman IL, Akashi K. Identification of Clonogenic Common Lymphoid Progenitors in Mouse Bone Marrow. *Cell.* 1997;91(5):661–72.
20. Carotta S, Pang SHM, Nutt SL, Belz GT. Identification of the earliest NK-cell precursor in the mouse BM. *Blood.* 2011;117(20):5449–52.
21. Kim S, Iizuka K, Kang H-SP, Dokun A, French AR, Greco S, et al. In vivo developmental stages in murine natural killer cell maturation. *Nat Immunol.* 2002;3(6):523–8.
22. Zhou H, Liao J, Aloor J, Nie H, Wilson BC, Fessler MB, et al. CD11b/CD18 (Mac-1) Is a Novel Surface Receptor for Extracellular Double-Stranded RNA To Mediate Cellular Inflammatory Responses. *J Immunol.* 2013;190(1):115–25.
23. Hendriks J, Gravestien LA, Tesselaar K, Lier RAW van, Schumacher TNM, Borst J. CD27 is required for generation and long-term maintenance of T cell immunity. *Nat Immunol.* 2000;1(5):433–40.
24. Hayakawa Y, Smyth MJ. CD27 Dissects Mature NK Cells into Two Subsets with Distinct Responsiveness and Migratory Capacity. *J Immunol.* 2006;176(3):1517–24.
25. Chiossone L, Chaix J, Fuseri N, Roth C, Vivier E, Walzer T. Maturation of mouse NK cells is a 4-stage developmental program. *Blood.* 2009;113(22):5488–96.

26. Crinier A, Narni-Mancinelli E, Ugolini S, Vivier E. SnapShot: Natural Killer Cells. *Cell*. 2020;180(6):1280-1280.e1.
27. Grégoire C, Chasson L, Luci C, Tomasello E, Geissmann F, Vivier E, et al. The trafficking of natural killer cells. *Immunol Rev*. 2007;220(1):169–82.
28. Zhang Y, Wallace DL, Lara CMD, Ghattas H, Asquith B, Worth A, et al. In vivo kinetics of human natural killer cells: the effects of ageing and acute and chronic viral infection. *Immunology*. 2007;121(2):258–65.
29. Jamieson AM, Isnard P, Dorfman JR, Coles MC, Raulet DH. Turnover and Proliferation of NK Cells in Steady State and Lymphopenic Conditions. *J Immunol*. 2004;172(2):864–70.
30. Abel AM, Yang C, Thakar MS, Malarkannan S. Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization. *Front Immunol*. 2018;9:1869.
31. Scoville SD, Freud AG, Caligiuri MA. Modeling Human Natural Killer Cell Development in the Era of Innate Lymphoid Cells. *Front Immunol*. 2017;8:360.
32. Yu J, Freud AG, Caligiuri MA. Location and cellular stages of natural killer cell development. *Trends Immunol*. 2013;34(12):573–82.
33. Lanier LL, Le AM, Civin CI, Loken MR, Phillips JH. The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1986;136(12):4480–6.
34. Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, Chen KS, Ghaehri BA, Ghayur T, et al. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood*. 2001;97(10):3146–51.
35. Jacobs R, Hintzen G, Kemper A, Beul K, Kempf S, Behrens G, et al. CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells. *Eur J Immunol*. 2001;31(10):3121–6.
36. Farag SS, Caligiuri MA. Human natural killer cell development and biology. *Blood Rev*. 2006;20(3):123–37.
37. Chan CW, Crafton E, Fan H-N, Flook J, Yoshimura K, Skarica M, et al. Interferon-producing killer dendritic cells provide a link between innate and adaptive immunity. *Nat Med*. 2006;12(2):207–13.

38. Taieb J, Chaput N, Ménard C, Apetoh L, Ullrich E, Bonmort M, et al. A novel dendritic cell subset involved in tumor immunosurveillance. *Nat Med*. 2006;12(2):214–9.
39. Himoudi N, Nabarro S, Buddle J, Eddaoudi A, Thrasher AJ, Anderson J. Bone Marrow-Derived IFN-Producing Killer Dendritic Cells Account for the Tumoricidal Activity of Unpulsed Dendritic Cells. *J Immunol*. 2008;181(9):6654–63.
40. Jiang Q, Wei H, Tian Z. IFN-producing killer dendritic cells contribute to the inhibitory effect of poly I:C on the progression of murine melanoma. *J Immunother Hagerstown Md* 1997. 2008;31(6):555–62.
41. Guimont-Desrochers F, Cappello ZJ, Chagnon M, McDuffie M, Lesage S. Cutting Edge: Genetic Characterization of IFN-Producing Killer Dendritic Cells. *J Immunol*. 2009;182(9):5193–7.
42. Guimont-Desrochers F, Boucher G, Dong Z, Dupuis M, Veillette A, Lesage S. Redefining interferon-producing killer dendritic cells as a novel intermediate in NK-cell differentiation. *Blood*. 2012;119(19):4349–57.
43. Guimont-Desrochers F, Lesage S. Revisiting the Prominent Anti-Tumoral Potential of Pre-mNK Cells. *Front Immunol*. 2013;4:446.
44. Chaput N, Flament C, Locher C, Desbois M, Rey A, Rusakiewicz S, et al. Phase I clinical trial combining imatinib mesylate and IL-2. *Oncoimmunology*. 2014;2(2):e23080.
45. Barton K, Muthusamy N, Fischer C, Ting C-N, Walunas TL, Lanier LL, et al. The Ets-1 Transcription Factor Is Required for the Development of Natural Killer Cells in Mice. *Immunity*. 1998;9(4):555–63.
46. Ramirez K, Chandler KJ, Spaulding C, Zandi S, Sigvardsson M, Graves BJ, et al. Gene Deregulation and Chronic Activation in Natural Killer Cells Deficient in the Transcription Factor ETS1. *Immunity*. 2012;36(6):921–32.
47. Seillet C, Huntington ND, Gangatirkar P, Axelsson E, Minnich M, Brady HJM, et al. Differential Requirement for Nfil3 during NK Cell Development. *J Immunol*. 2014;192(6):2667–76.
48. Yang Q, Li F, Harly C, Xing S, Ye L, Xia X, et al. TCF-1 upregulation identifies early innate lymphoid progenitors in the bone marrow. *Nat Immunol*. 2015;16(10):1044–50.

49. Yokota Y, Mansouri A, Mori S, Sugawara S, Adachi S, Nishikawa S-I, et al. Development of peripheral lymphoid organs and natural killer cells depends on the helix–loop–helix inhibitor Id2. *Nature*. 1999;397(6721):702–6.
50. Delconte RB, Shi W, Sathe P, Ushiki T, Seillet C, Minnich M, et al. The Helix-Loop-Helix Protein ID2 Governs NK Cell Fate by Tuning Their Sensitivity to Interleukin-15. *Immunity*. 2016;44(1):103–15.
51. Boos MD, Yokota Y, Eberl G, Kee BL. Mature natural killer cell and lymphoid tissue–inducing cell development requires Id2-mediated suppression of E protein activity. *J Exp Medicine*. 2007;204(5):1119–30.
52. Kallies A, Carotta S, Huntington ND, Bernard NJ, Tarlinton DM, Smyth MJ, et al. A role for Blimp1 in the transcriptional network controlling natural killer cell maturation. *Blood*. 2010;117(6):1869–79.
53. Townsend MJ, Weinmann AS, Matsuda JL, Salomon R, Farnham PJ, Biron CA, et al. T-bet Regulates the Terminal Maturation and Homeostasis of NK and V α 14i NKT Cells. *Immunity*. 2004;20(4):477–94.
54. Gordon SM, Chaix J, Rupp LJ, Wu J, Madera S, Sun JC, et al. The Transcription Factors T-bet and Eomes Control Key Checkpoints of Natural Killer Cell Maturation. *Immunity*. 2012;36(1):55–67.
55. Park CS, Lee P, Yamada T, Burns A, Shen Y, Puppi M, et al. Krüppel-like factor 4 (KLF4) promotes the survival of natural killer cells and maintains the number of conventional dendritic cells in the spleen. *J Leukocyte Biol*. 2012;91(5):739–50.
56. Samson SI, Richard O, Tavian M, Ranson T, Vosshenrich CAJ, Colucci F, et al. GATA-3 Promotes Maturation, IFN- γ Production, and Liver-Specific Homing of NK Cells. *Immunity*. 2003;19(5):701–11.
57. Deng Y, Kerdiles Y, Chu J, Yuan S, Wang Y, Chen X, et al. Transcription Factor Foxo1 Is a Negative Regulator of Natural Killer Cell Maturation and Function. *Immunity*. 2015;42(3):457–70.
58. Holmes ML, Huntington ND, Thong RP, Brady J, Hayakawa Y, Andoniou CE, et al. Peripheral natural killer cell maturation depends on the transcription factor Aiolos. *Embo J*. 2014;33(22):2721–34.

59. Lacorazza HD, Miyazaki Y, Cristofano AD, Deblasio A, Hedvat C, Zhang J, et al. The ETS Protein MEF Plays a Critical Role in Perforin Gene Expression and the Development of Natural Killer and NK-T Cells. *Immunity*. 2002;17(4):437–49.
60. Rosmaraki EE, Douagi I, Roth C, Colucci F, Cumano A, Santo JPD. Identification of committed NK cell progenitors in adult murine bone marrow. *Eur J Immunol*. 2001;31(6):1900–9.
61. Meazza R, Azzarone B, Orengo AM, Ferrini S. Role of Common-Gamma Chain Cytokines in NK Cell Development and Function: Perspectives for Immunotherapy. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:861920.
62. Vosshenrich CAJ, Ranson T, Samson SI, Corcuff E, Colucci F, Rosmaraki EE, et al. Roles for Common Cytokine Receptor γ -Chain-Dependent Cytokines in the Generation, Differentiation, and Maturation of NK Cell Precursors and Peripheral NK Cells in Vivo. *J Immunol*. 2005;174(3):1213–21.
63. Cao X, Shores EW, Hu-Li J, Anver MR, Kelsail BL, Russell SM, et al. Defective lymphoid development in mice lacking expression of the common cytokine receptor γ chain. *Immunity*. 1995;2(3):223–38.
64. Cooper MA, Bush JE, Fehniger TA, VanDeusen JB, Waite RE, Liu Y, et al. In vivo evidence for a dependence on interleukin 15 for survival of natural killer cells. *Blood*. 2002;100(10):3633–8.
65. Gasteiger G, Hemmers S, Firth MA, Floc'h AL, Huse M, Sun JC, et al. IL-2–dependent tuning of NK cell sensitivity for target cells is controlled by regulatory T cells. T reg cells restrain adaptive help for NK cells. *J Exp Medicine*. 2013;210(6):1167–78.
66. Puel A, Ziegler SF, Buckley RH, Leonard WJ. Defective IL7R expression in T-B+NK+ severe combined immunodeficiency. *Nat Genet*. 1998;20(4):394–7.
67. Brady J, Carotta S, Thong RPL, Chan CJ, Hayakawa Y, Smyth MJ, et al. The Interactions of Multiple Cytokines Control NK Cell Maturation. *J Immunol*. 2010;185(11):6679–88.
68. Ranson T, Vosshenrich CAJ, Corcuff E, Richard O, Müller W, Santo JPD. IL-15 is an essential mediator of peripheral NK-cell homeostasis. *Blood*. 2003;101(12):4887–93.
69. Brady J, Hayakawa Y, Smyth MJ, Nutt SL. IL-21 Induces the Functional Maturation of Murine NK Cells. *J Immunol*. 2004;172(4):2048–58.

70. Kim S, Poursine-Laurent J, Truscott SM, Lybarger L, Song Y-J, Yang L, et al. Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature*. 2005;436(7051):709–13.
71. Raulet DH, Vance RE. Self-tolerance of natural killer cells. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(7):520–31.
72. Brodin P, Kärre K, Höglund P. NK cell education: not an on-off switch but a tunable rheostat. *Trends Immunol*. 2009;30(4):143–9.
73. Joncker NT, Fernandez NC, Treiner E, Vivier E, Raulet DH. NK Cell Responsiveness Is Tuned Commensurate with the Number of Inhibitory Receptors for Self-MHC Class I: The Rheostat Model. *J Immunol*. 2009;182(8):4572–80.
74. Boudreau JE, Hsu KC. Natural Killer Cell Education and the Response to Infection and Cancer Therapy: Stay Tuned. *Trends Immunol*. 2018;39(3):222–39.
75. Fernandez NC, Treiner E, Vance RE, Jamieson AM, Lemieux S, Raulet DH. A subset of natural killer cells achieves self-tolerance without expressing inhibitory receptors specific for self-MHC molecules. *Blood*. 2005;105(11):4416–23.
76. McNerney ME, Guzior D, Kumar V. 2B4 (CD244)-CD48 interactions provide a novel MHC class I-independent system for NK-cell self-tolerance in mice. *Blood*. 2005;106(4):1337–40.
77. Colucci F, Santo JPD, Leibson PJ. Natural killer cell activation in mice and men: different triggers for similar weapons? *Nat Immunol*. 2002;3(9):807–13.
78. Perussia B, Starr S, Abraham S, Fanning V, Trinchieri G. Human natural killer cells analyzed by B73.1, a monoclonal antibody blocking Fc receptor functions. I. Characterization of the lymphocyte subset reactive with B73.1. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1983;130(5):2133–41.
79. Bryceson YT, Long EO. Line of attack: NK cell specificity and integration of signals. *Curr Opin Immunol*. 2008;20(3):344–52.
80. Bottino C, Biassoni R, Millo R, Moretta L, Moretta A. The human natural cytotoxicity receptors (NCR) that induce HLA class I-independent NK cell triggering. *Hum Immunol*. 2000;61(1):1–6.
81. Raulet DH. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(10):781–90.

82. Garni-Wagner BA, Purohit A, Mathew PA, Bennett M, Kumar V. A novel function-associated molecule related to non-MHC-restricted cytotoxicity mediated by activated natural killer cells and T cells. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1993;151(1):60–70.
83. Bottino C, Castriconi R, Pende D, Rivera P, Nanni M, Carnemolla B, et al. Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as Cell Surface Ligands for the Human DNAM-1 (CD226) Activating Molecule. *J Exp Medicine*. 2003;198(4):557–67.
84. Gilfillan S, Ho EL, Cella M, Yokoyama WM, Colonna M. NKG2D recruits two distinct adapters to trigger NK cell activation and costimulation. *Nat Immunol*. 2002;3(12):1150–5.
85. Kumar V, McNerney ME. A new self: MHC-class-I-independent Natural-killer-cell self-tolerance. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(5):363–74.
86. Elliott JM, Yokoyama WM. Unifying concepts of MHC-dependent natural killer cell education. *Trends Immunol*. 2011;32(8):364–72.
87. Orange JS, Harris KE, Andzelm MM, Valter MM, Geha RS, Strominger JL. The mature activating natural killer cell immunologic synapse is formed in distinct stages. *Proc National Acad Sci*. 2003;100(24):14151–6.
88. Mace EM, Wu WW, Ho T, Mann SS, Hsu H-T, Orange JS. NK Cell Lytic Granules Are Highly Motile at the Immunological Synapse and Require F-Actin for Post-Degranulation Persistence. *J Immunol*. 2012;189(10):4870–80.
89. Mizesko MC, Banerjee PP, Monaco-Shawver L, Mace EM, Bernal WE, Sawalle-Belohradsky J, et al. Defective actin accumulation impairs human natural killer cell function in patients with dedicator of cytokinesis 8 deficiency. *J Allergy Clin Immun*. 2013;131(3):840–8.
90. Chen X, Trivedi PP, Ge B, Krzewski K, Strominger JL. Many NK cell receptors activate ERK2 and JNK1 to trigger microtubule organizing center and granule polarization and cytotoxicity. *Proc National Acad Sci*. 2007;104(15):6329–34.
91. Krzewski K, Strominger JL. The killer's kiss: the many functions of NK cell immunological synapses. *Curr Opin Cell Biol*. 2008;20(5):597–605.
92. Paul S, Lal G. The Molecular Mechanism of Natural Killer Cells Function and Its Importance in Cancer Immunotherapy. *Front Immunol*. 2017;8:1124.

93. Alter G, Malenfant JM, Altfeld M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J Immunol Methods*. 2004;294(1–2):15–22.
94. Osińska I, Popko K, Demkow U. Perforin: an important player in immune response. *Central-european J Immunol*. 2014;39(1):109–15.
95. Atkinson EA, Barry M, Darmon AJ, Shostak I, Turner PC, Moyer RW, et al. Cytotoxic T Lymphocyte-assisted Suicide: CASPASE 3 ACTIVATION IS PRIMARILY THE RESULT OF THE DIRECT ACTION OF GRANZYME B. *J Biol Chem*. 1998;273(33):21261–6.
96. Barry M, Heibein JA, Pinkoski MJ, Lee S-F, Moyer RW, Green DR, et al. Granzyme B Short-Circuits the Need for Caspase 8 Activity during Granule-Mediated Cytotoxic T-Lymphocyte Killing by Directly Cleaving Bid. *Mol Cell Biol*. 2000;20(11):3781–94.
97. Pinkoski MJ, Waterhouse NJ, Heibein JA, Wolf BB, Kuwana T, Goldstein JC, et al. Granzyme B-mediated Apoptosis Proceeds Predominantly through a Bcl-2-inhibitable Mitochondrial Pathway. *J Biol Chem*. 2001;276(15):12060–7.
98. Smyth MJ, Cretney E, Kelly JM, Westwood JA, Street SEA, Yagita H, et al. Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol Immunol*. 2005;42(4):501–10.
99. Thorburn A. Death receptor-induced cell killing. *Cell Signal*. 2004;16(2):139–44.
100. Smyth MJ, Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H. New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(11):850–61.
101. Takeda K, Hayakawa Y, Smyth MJ, Kayagaki N, Yamaguchi N, Kakuta S, et al. Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells. *Nat Med*. 2001;7(1):94–100.
102. Cretney E, Takeda K, Yagita H, Glaccum M, Peschon JJ, Smyth MJ. Increased Susceptibility to Tumor Initiation and Metastasis in TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand-Deficient Mice. *J Immunol*. 2002;168(3):1356–61.
103. Screpanti V, Wallin RPA, Ljunggren H-G, Grandien A. A Central Role for Death Receptor-Mediated Apoptosis in the Rejection of Tumors by NK Cells. *J Immunol*. 2001;167(4):2068–73.
104. Nigro CL, Macagno M, Sangiolo D, Bertolaccini L, Aglietta M, Merlano MC. NK-mediated antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in solid tumors: biological evidence and clinical perspectives. *Ann Transl Medicine*. 2019;7(5):105–105.

105. Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, et al. Innate or Adaptive Immunity? The Example of Natural Killer Cells. *Science*. 2011;331(6013):44–9.
106. Walzer T, Dalod M, Robbins SH, Zitvogel L, Vivier E. Natural-killer cells and dendritic cells: “l’union fait la force.” *Blood*. 2005;106(7):2252–8.
107. Reefman E, Kay JG, Wood SM, Offenhäuser C, Brown DL, Roy S, et al. Cytokine Secretion Is Distinct from Secretion of Cytotoxic Granules in NK Cells. *J Immunol*. 2010;184(9):4852–62.
108. Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS, Stockert E, Aguet M, Old LJ, et al. Demonstration of an interferon γ -dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc National Acad Sci*. 1998;95(13):7556–61.
109. Marcus A, Mao AJ, Lensink-Vasan M, Wang L, Vance RE, Raulet DH. Tumor-Derived cGAMP Triggers a STING-Mediated Interferon Response in Non-tumor Cells to Activate the NK Cell Response. *Immunity*. 2018;49(4):754–763.e4.
110. Poggi A, Zocchi MR. NK Cell Autoreactivity and Autoimmune Diseases. *Front Immunol*. 2014;5:27.
111. Jewett A, Man Y-G, Tseng H-C. Dual Functions of Natural Killer Cells in Selection and Differentiation of Stem Cells; Role in Regulation of Inflammation and Regeneration of Tissues. *J Cancer*. 2013;4(1):12–24.
112. Gazit R, Gruda R, Elboim M, Arnon TI, Katz G, Achdout H, et al. Lethal influenza infection in the absence of the natural killer cell receptor gene *Ncr1*. *Nat Immunol*. 2006;7(5):517–23.
113. Orange JS, Fassett MS, Koopman LA, Boyson JE, Strominger JL. Viral evasion of natural killer cells. *Nat Immunol*. 2002;3(11):1006–12.
114. Hudspeth K, Silva-Santos B, Mavilio D. Natural Cytotoxicity Receptors: Broader Expression Patterns and Functions in Innate and Adaptive Immune Cells. *Front Immunol*. 2013;4:69.
115. Ma LL, Wang CLC, Neely GG, Epelman S, Krensky AM, Mody CH. NK Cells Use Perforin Rather than Granulysin for Anticryptococcal Activity. *J Immunol*. 2004;173(5):3357–65.
116. Elhaik-Goldman S, Kafka D, Yossef R, Hadad U, Elkabets M, Vallon-Eberhard A, et al. The Natural Cytotoxicity Receptor 1 Contribution to Early Clearance of *Streptococcus pneumoniae* and to Natural Killer-Macrophage Cross Talk. *Plos One*. 2011;6(8):e23472.

117. Riccardi C, Santoni A, Barlozzari T, Puccetti P, Herberman RB. In vivo natural reactivity of mice against tumor cells. *Int J Cancer*. 1980;25(4):475–86.
118. Gorelik E, Rosen B, Copeland D, Weatherly B, Herberman RB. Evaluation of role of natural killer cells in radiation-induced leukemogenesis in mice. *J Natl Cancer I*. 1984;72(6):1397–403.
119. Ljunggren HG, Kärre K. Host resistance directed selectively against H-2-deficient lymphoma variants. Analysis of the mechanism. *J Exp Medicine*. 1985;162(6):1745–59.
120. Smyth MJ, Crowe NY, Godfrey DI. NK cells and NKT cells collaborate in host protection from methylcholanthrene-induced fibrosarcoma. *Int Immunol*. 2001;13(4):459–63.
121. Ballas ZK, Buchta CM, Rosean TR, Heusel JW, Shey MR. Role of NK Cell Subsets in Organ-Specific Murine Melanoma Metastasis. *Plos One*. 2013;8(6):e65599.
122. Ilander M, Olsson-Strömberg U, Schlums H, Guilhot J, Brück O, Lähdenmäki H, et al. Increased proportion of mature NK cells is associated with successful imatinib discontinuation in chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2017;31(5):1108–16.
123. Street SEA, Hayakawa Y, Zhan Y, Lew AM, MacGregor D, Jamieson AM, et al. Innate Immune Surveillance of Spontaneous B Cell Lymphomas by Natural Killer Cells and $\gamma\delta$ T Cells. *J Exp Medicine*. 2004;199(6):879–84.
124. López-Soto A, Gonzalez S, Smyth MJ, Galluzzi L. Control of Metastasis by NK Cells. *Cancer Cell*. 2017;32(2):135–54.
125. Du Y, Wei Y. Therapeutic Potential of Natural Killer Cells in Gastric Cancer. *Front Immunol*. 2019;9:3095.
126. Xu B, Chen L, Li J, Zheng X, Shi L, Wu C, et al. Prognostic value of tumor infiltrating NK cells and macrophages in stage II+III esophageal cancer patients. *Oncotarget*. 2016;5(0):74904–16.
127. Hoshikawa M, Aoki T, Matsushita H, Karasaki T, Hosoi A, Odaira K, et al. NK cell and IFN signatures are positive prognostic biomarkers for resectable pancreatic cancer. *Biochem Bioph Res Co*. 2018;495(2):2058–65.
128. Garcia-Chagollan M, Carranza-Torres IE, Carranza-Rosales P, Guzmán-Delgado NE, Ramírez-Montoya H, Martínez-Silva MG, et al. Expression of NK Cell Surface Receptors in Breast Cancer Tissue as Predictors of Resistance to Antineoplastic Treatment. *Technol Cancer Res T*. 2018;17:1533033818764499.

129. Orange JS. Natural killer cell deficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132(3):515–25.
130. Fang F, Xiao W, Tian Z. NK cell-based immunotherapy for cancer. *Semin Immunol*. 2017;31:37–54.
131. Floros T, Tarhini AA. Anticancer Cytokines: Biology and Clinical Effects of Interferon- α 2, Interleukin (IL)-2, IL-15, IL-21, and IL-12. *Semin Oncol*. 2015;42(4):539–48.
132. Levin AM, Bates DL, Ring AM, Krieg C, Lin JT, Su L, et al. Exploiting a natural conformational switch to engineer an interleukin-2 ‘superkine.’ *Nature*. 2012;484(7395):529–33.
133. Koerner SP, André MC, Leibold JS, Kousis PC, Kübler A, Pal M, et al. An Fc-optimized CD133 antibody for induction of NK cell reactivity against myeloid leukemia. *Leukemia*. 2017;31(2):459–69.
134. André P, Denis C, Soulas C, Bourbon-Caillet C, Lopez J, Arnoux T, et al. Anti-NKG2A mAb Is a Checkpoint Inhibitor that Promotes Anti-tumor Immunity by Unleashing Both T and NK Cells. *Cell*. 2018;175(7):1731-1743.e13.
135. Kohrt HE, Houot R, Weiskopf K, Goldstein MJ, Scheeren F, Czerwinski D, et al. Stimulation of natural killer cells with a CD137-specific antibody enhances trastuzumab efficacy in xenotransplant models of breast cancer. *J Clin Invest*. 2012;122(3):1066–75.
136. Felices M, Lenvik TR, Davis ZB, Miller JS, Vallera DA. Natural Killer Cells, Methods and Protocols. 2016;333–46.
137. Gleason MK, Ross JA, Warlick ED, Lund TC, Verneris MR, Wiernik A, et al. CD16xCD33 bispecific killer cell engager (BiKE) activates NK cells against primary MDS and MDSC CD33+ targets. *Blood*. 2014;123(19):3016–26.
138. Dolstra H, Roeven MWH, Spanholtz J, Hangalapura BN, Tordoir M, Maas F, et al. Successful Transfer of Umbilical Cord Blood CD34+ Hematopoietic Stem and Progenitor-derived NK Cells in Older Acute Myeloid Leukemia Patients. *Clin Cancer Res*. 2017;23(15):4107–18.
139. Suck G, Odendahl M, Nowakowska P, Seidl C, Wels WS, Klingemann HG, et al. NK-92: an ‘off-the-shelf therapeutic’ for adoptive natural killer cell-based cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*. 2016;65(4):485–92.

140. Olson JA, Leveson-Gower DB, Gill S, Baker J, Beilhack A, Negrin RS. NK cells mediate reduction of GVHD by inhibiting activated, alloreactive T cells while retaining GVT effects. *Blood*. 2010;115(21):4293–301.
141. Curti A, Ruggeri L, D’Addio A, Bontadini A, Dan E, Motta MR, et al. Successful transfer of alloreactive haploidentical KIR ligand-mismatched natural killer cells after infusion in elderly high risk acute myeloid leukemia patients. *Blood*. 2011;118(12):3273–9.
142. Mehta RS, Rezvani K. Chimeric Antigen Receptor Expressing Natural Killer Cells for the Immunotherapy of Cancer. *Front Immunol*. 2018;9:283.
143. Sotillo E, Barrett DM, Black KL, Bagashev A, Oldridge D, Wu G, et al. Convergence of Acquired Mutations and Alternative Splicing of CD19 Enables Resistance to CART-19 Immunotherapy. *Cancer Discov*. 2015;5(12):1282–95.
144. Hu W, Wang G, Huang D, Sui M, Xu Y. Cancer Immunotherapy Based on Natural Killer Cells: Current Progress and New Opportunities. *Front Immunol*. 2019;10:1205.
145. Cheng M, Chen Y, Xiao W, Sun R, Tian Z. NK cell-based immunotherapy for malignant diseases. *Cell Mol Immunol*. 2013;10(3):230–52.
146. Lorenzo-Herrero S, López-Soto A, Sordo-Bahamonde C, Gonzalez-Rodriguez AP, Vitale M, Gonzalez S. NK Cell-Based Immunotherapy in Cancer Metastasis. *Cancers*. 2018;11(1):29.
147. Farber DL, Netea MG, Radbruch A, Rajewsky K, Zinkernagel RM. Immunological memory: lessons from the past and a look to the future. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(2):124–8.
148. Cerwenka A, Lanier LL. Natural killer cell memory in infection, inflammation and cancer. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(2):112–23.
149. O’Leary JG, Goodarzi M, Drayton DL, Andrian UH von. T cell– and B cell–independent adaptive immunity mediated by natural killer cells. *Nat Immunol*. 2006;7(5):507–16.
150. Sun JC, Beilke JN, Lanier LL. Adaptive immune features of natural killer cells. *Nature*. 2009;457(7229):557–61.
151. Cooper MA, Elliott JM, Keyel PA, Yang L, Carrero JA, Yokoyama WM. Cytokine-induced memory-like natural killer cells. *P Natl Acad Sci Usa*. 2009;106(6):1915–9.

152. Zhang Y, Wang H. Integrin signalling and function in immune cells. *Immunology*. 2012;135(4):268–75.
153. Hynes RO. Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*. 1992;69(1):11–25.
154. Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin Signaling. *Science*. 1999;285(5430):1028–33.
155. Gahmberg CG, Fagerholm SC, Nurmi SM, Chavakis T, Marchesan S, Grönholm M. Regulation of integrin activity and signalling. *Biochimica Et Biophysica Acta Bba - Gen Subj*. 2009;1790(6):431–44.
156. Yang JT, Rayburn H, Hynes RO. Embryonic mesodermal defects in alpha 5 integrin-deficient mice. *Dev Camb Engl*. 1993;119(4):1093–105.
157. Arnaout MA. Leukocyte Adhesion Molecules Deficiency: Its Structural Basis, Pathophysiology and Implications for Modulating the Inflammatory Response. *Immunol Rev*. 1990;114(1):145–80.
158. Nath SK, Han S, Kim-Howard X, Kelly JA, Viswanathan P, Gilkeson GS, et al. A nonsynonymous functional variant in integrin- α M (encoded by ITGAM) is associated with systemic lupus erythematosus. *Nat Genet*. 2008;40(2):152–4.
159. Lange KM de, Moutsianas L, Lee JC, Lamb CA, Luo Y, Kennedy NA, et al. Genome-wide association study implicates immune activation of multiple integrin genes in inflammatory bowel disease. *Nat Genet*. 2017;49(2):256–61.
160. Harjunpää H, Asens ML, Guenther C, Fagerholm SC. Cell Adhesion Molecules and Their Roles and Regulation in the Immune and Tumor Microenvironment. *Front Immunol*. 2019;10:1078.
161. Mould AP, Humphries MJ. Regulation of integrin function through conformational complexity: not simply a knee-jerk reaction? *Curr Opin Cell Biol*. 2004;16(5):544–51.
162. Adair BD, Xiong J-P, Maddock C, Goodman SL, Arnaout MA, Yeager M. Three-dimensional EM structure of the ectodomain of integrin α V β 3 in a complex with fibronectin. *J Cell Biology*. 2005;168(7):1109–18.
163. Stewart M, Hogg N. Regulation of leukocyte integrin function: Affinity vs. avidity. *J Cell Biochem*. 1996;61(4):554–61.

164. Schittenhelm L, Hilkens CM, Morrison VL. β 2 Integrins As Regulators of Dendritic Cell, Monocyte, and Macrophage Function. *Front Immunol.* 2017;8:1866.
165. Urlaub D, Höfer K, Müller M-L, Watzl C. LFA-1 Activation in NK Cells and Their Subsets: Influence of Receptors, Maturation, and Cytokine Stimulation. *J Immunol.* 2017;198(5):1944–51.
166. Hsu H-T, Orange JS. Distinct integrin-dependent signals define requirements for lytic granule convergence and polarization in natural killer cells. *Sci Signal.* 2014;7(346):pe24.
167. Crozat K, Eidenschenk C, Jaeger BN, Krebs P, Guia S, Beutler B, et al. Impact of β 2 integrin deficiency on mouse natural killer cell development and function. *Blood.* 2011;117(10):2874–82.
168. Balkow S, Heinz S, Schmidbauer P, Kolanus W, Holzmann B, Grabbe S, et al. LFA-1 activity state on dendritic cells regulates contact duration with T cells and promotes T-cell priming. *Blood.* 2010;116(11):1885–94.
169. Carrasco YR, Fleire SJ, Cameron T, Dustin ML, Batista FD. LFA-1/ICAM-1 Interaction Lowers the Threshold of B Cell Activation by Facilitating B Cell Adhesion and Synapse Formation. *Immunity.* 2004;20(5):589–99.
170. Humphries JD, Byron A, Humphries MJ. Integrin ligands at a glance. *J Cell Sci.* 2006;119(19):3901–3.
171. Han C, Jin J, Xu S, Liu H, Li N, Cao X. Integrin CD11b negatively regulates TLR-triggered inflammatory responses by activating Syk and promoting degradation of MyD88 and TRIF via Cbl-b. *Nat Immunol.* 2010;11(8):734–42.
172. Plow EF, Zhang L. A MAC-1 attack: integrin functions directly challenged in knockout mice. *J Clin Invest.* 1997;99(6):1145–6.
173. Luo B-H, Carman CV, Springer TA. Structural Basis of Integrin Regulation and Signaling. *Annu Rev Immunol.* 2007;25(1):619–47.
174. Yakubenko VP, Belevych N, Mishchuk D, Schurin A, Lam SC-T, Ugarova TP. The role of integrin α D β 2 (CD11d/CD18) in monocyte/macrophage migration. *Exp Cell Res.* 2008;314(14):2569–78.
175. Tan S-M. The leucocyte β 2 (CD18) integrins: the structure, functional regulation and signalling properties. *Bioscience Rep.* 2012;32(3):241–69.

176. Moussa P, Marton J, Vidal SM, Fodil-Cornu N. Genetic dissection of NK cell responses. *Front Immunol.* 2013;3:425.

177. Guimont-Desrochers F. Étude génétique et fonctionnelle des Interferon - producing Killer Dendritic Cells. 2012.

178. Wong DA, Davis EM, LeBeau M, Springer TA. Cloning and chromosomal localization of a novel gene-encoding a human $\beta 2$ -integrin α subunit. *Gene.* 1996;171(2):291–4.

179. Mabon PJ, Weaver LC, Dekaban GA. Inhibition of Monocyte/Macrophage Migration to a Spinal Cord Injury Site by an Antibody to the Integrin αD : A Potential New Anti-inflammatory Treatment. *Exp Neurol.* 2000;166(1):52–64.

180. Wu H, Rodgers JR, Perrard X-YD, Perrard JL, Prince JE, Abe Y, et al. Deficiency of CD11b or CD11d Results in Reduced Staphylococcal Enterotoxin-Induced T Cell Response and T Cell Phenotypic Changes. *J Immunol.* 2004;173(1):297–306.

181. Bao F, Chen Y, Dekaban GA, Weaver LC. An anti-CD11d integrin antibody reduces cyclooxygenase-2 expression and protein and DNA oxidation after spinal cord injury in rats. *J Neurochem.* 2004;90(5):1194–204.

182. Grayson MH, Vieren MV der, Sterbinsky SA, Gallatin WM, Hoffman PA, Staunton DE, et al. $\alpha\beta 2$ Integrin Is Expressed on Human Eosinophils and Functions as an Alternative Ligand for Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1). *J Exp Med.* 1998;188(11):2187–91.

183. Costantini C, Micheletti A, Calzetti F, Perbellini O, Tamassia N, Albanesi C, et al. On the potential involvement of CD11d in co-stimulating the production of interferon- γ by natural killer cells upon interaction with neutrophils via intercellular adhesion molecule-3. *Haematologica.* 2011;96(10):1543–7.

184. Thomas AP, Dunn TN, Oort PJ, Grino M, Adams SH. Inflammatory Phenotyping Identifies CD11d as a Gene Markedly Induced in White Adipose Tissue in Obese Rodents and Women. *J Nutrition.* 2011;141(6):1172–80.

185. Dinarello CA. Blocking interleukin-1 β in acute and chronic autoinflammatory diseases. *J Intern Med.* 2011;269(1):16–28.

186. Gris D, Marsh DR, Oatway MA, Chen Y, Hamilton EF, Dekaban GA, et al. Transient Blockade of the CD11d/CD18 Integrin Reduces Secondary Damage after Spinal Cord Injury, Improving Sensory, Autonomic, and Motor Function. *J Neurosci.* 2004;24(16):4043–51.

187. Rosenthal N, Brown S. The mouse ascending: perspectives for human-disease models. *Nat Cell Biol.* 2007;9(9):993–9.
188. Bryant CD. The blessings and curses of C57BL/6 substrains in mouse genetic studies. *Ann Ny Acad Sci.* 2011;1245(1):31–3.
189. Song HK, Hwang DY. Use of C57BL/6N mice on the variety of immunological researches. *Laboratory Animal Res.* 2017;33(2):119–23.
190. Hall B, Limaye A, Kulkarni AB. Overview: Generation of Gene Knockout Mice. *Curr Protoc Cell Biology.* 2009;44(1):19.12.1-19.12.17.
191. Anderson MS, Bluestone JA. THE NOD MOUSE: A Model of Immune Dysregulation. *Annu Rev Immunol.* 2005;23(1):447–85.
192. Delovitch TL, Singh B. The Nonobese Diabetic Mouse as a Model of Autoimmune Diabetes: Immune Dysregulation Gets the NOD. *Immunity.* 1997;7(6):727–38.
193. Ikegami H, Fujisawa T, Sakamoto T, Makino S, Ogihara T. Idd1 and Idd3 are necessary but not sufficient for development of type 1 diabetes in NOD mouse. *Diabetes Res Clin Pr.* 2004;66:S85–90.
194. Aoki CA, Borchers AT, Ridgway WM, Keen CL, Ansari AA, Gershwin ME. NOD mice and autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2005;4(6):373–9.
195. Kataoka S, Satoh J, Fujiya H, Toyota T, Suzuki R, Itoh K, et al. Immunologic Aspects of the Nonobese Diabetic (NOD) Mouse: Abnormalities of Cellular Immunity. *Diabetes.* 1983;32(3):247–53.
196. Shultz LD, Schweitzer PA, Christianson SW, Gott B, Schweitzer IB, Tennent B, et al. Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1995;154(1):180–91.
197. Ogasawara K, Hamerman JA, Hsin H, Chikuma S, Bour-Jordan H, Chen T, et al. Impairment of NK Cell Function by NKG2D Modulation in NOD Mice. *Immunity.* 2003;18(1):41–51.
198. Johansson SE, Hall H, Björklund J, Höglund P. Broadly impaired NK cell function in non-obese diabetic mice is partially restored by NK cell activation in vivo and by IL-12/IL-18 in vitro. *Int Immunol.* 2004;16(1):1–11.

199. Carnaud C, Gombert J-M, Donnars O, Garchon H-J, Herbelin A. Protection Against Diabetes and Improved NK/NKT Cell Performance in NOD.NK1.1 Mice Congenic at the NK Complex. *J Immunol.* 2001;166(4):2404–11.
200. Rodacki M, Milech A, Oliveira JEP de. NK Cells and Type 1 Diabetes. *Clin Dev Immunol.* 2006;13(2–4):101–7.
201. Rogner UC, Boitard C, Morin J, Melanitou E, Avner P. Three Loci on Mouse Chromosome 6 Influence Onset and Final Incidence of Type I Diabetes in NOD.C3H Congenic Strains. *Genomics.* 2001;74(2):163–71.
202. Brown MG, Fulmek S, Matsumoto K, Cho R, Lyons PA, Levy ER, et al. A 2-Mb YAC Contig and Physical Map of the Natural Killer Gene Complex on Mouse Chromosome 6. *Genomics.* 1997;42(1):16–25.
203. Belanger S, Tai L-H, Anderson SK, Makrigiannis AP. Ly49 cluster sequence analysis in a mouse model of diabetes: an expanded repertoire of activating receptors in the NOD genome. *Genes Immun.* 2008;9(6):509–21.
204. Poirot L, Benoist C, Mathis D. Natural killer cells distinguish innocuous and destructive forms of pancreatic islet autoimmunity. *Proc National Acad Sci.* 2004;101(21):8102–7.
205. Poulton LD, Smyth MJ, Hawke CG, Silveira P, Shepherd D, Naidenko OV, et al. Cytometric and functional analyses of NK and NKT cell deficiencies in NOD mice. *Int Immunol.* 2001;13(7):887–96.
206. Suwanai H, Wilcox MA, Mathis D, Benoist C. A defective Il15 allele underlies the deficiency in natural killer cell activity in nonobese diabetic mice. *Proc National Acad Sci.* 2010;107(20):9305–10.
207. Collin R, St-Pierre C, Guilbault L, Mullins-Dansereau V, Policheni A, Guimont-Desrochers F, et al. An Unbiased Linkage Approach Reveals That the p53 Pathway Is Coupled to NK Cell Maturation. *J Immunol.* 2017;199(4):1490–504.
208. Pelletier A-N, Guilbault L, Guimont-Desrochers F, Hillhouse EE, Lesage S. NK Cell Proportion and Number Are Influenced by Genetic Loci on Chromosomes 8, 9, and 17. *J Immunol.* 2016;196(6):2627–36.
209. Shultz LD, Brehm MA, Garcia-Martinez JV, Greiner DL. Humanized mice for immune system investigation: progress, promise and challenges. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(11):786–98.

210. Belizario JE. Immunodeficient Mouse Models: An Overview. *Open Immunol J.* 2009;2(1):79–85.
211. Taxman DJ, Moore CB, Guthrie EH, Huang MT-H. RNA Therapeutics, Function, Design, and Delivery. *Methods Mol Biology.* 2010;629:139–56.
212. Gene: *Ilgad* [Internet]. n.d. [cited 2021 Apr 4]. Available from: https://useast.ensembl.org/Mus_musculus/Location/View?db=core;g=ENSMUSG00000070369;r=7:127331132-127410483
213. Kwee L, Baldwin HS, Shen HM, Stewart CL, Buck C, Buck CA, et al. Defective development of the embryonic and extraembryonic circulatory systems in vascular cell adhesion molecule (VCAM-1) deficient mice. *Dev Camb Engl.* 1995;121(2):489–503.
214. Gurtner GC, Davis V, Li H, McCoy MJ, Sharpe A, Cybulsky MI. Targeted disruption of the murine VCAM1 gene: essential role of VCAM-1 in chorioallantoic fusion and placentation. *Gene Dev.* 1995;9(1):1–14.
215. Koni PA, Joshi SK, Temann U-A, Olson D, Burkly L, Flavell RA. Conditional Vascular Cell Adhesion Molecule 1 Deletion in Mice. *J Exp Med.* 2001;193(6):741–54.
216. Elsner L, Dressel R. Chapter Twenty-Seven 51Cr-release to monitor NK cell cytotoxicity. *Methods Enzymol.* 2020;631:497–512.
217. Taverna D, Moher H, Crowley D, Borsig L, Varki A, Hynes RO. Increased primary tumor growth in mice null for $\beta 3$ - or $\beta 3/\beta 5$ -integrins or selectins. *P Natl Acad Sci Usa.* 2004;101(3):763–8.
218. Schmits R, Kündig TM, Baker DM, Shumaker G, Simard JJ, Duncan G, et al. LFA-1-deficient mice show normal CTL responses to virus but fail to reject immunogenic tumor. *J Exp Medicine.* 1996;183(4):1415–26.
219. Humphries JD, Byron A, Humphries MJ. Integrin ligands at a glance. *J Cell Sci.* 2006;119(19):3901–3.
220. Yakubenko VP, Yadav SP, Ugarova TP. Integrin $\alpha\beta 2$, an adhesion receptor up-regulated on macrophage foam cells, exhibits multiligand-binding properties. *Blood.* 2006;107(4):1643–50.
221. Vieren MV der, Trong HL, Wood CL, Moore PF, John TSt, Staunton DE, et al. A novel leukointegrin, $\alpha\beta 2$, binds preferentially to ICAM-3. *Immunity.* 1995;3(6):683–90.

222. Noti JD. Expression of the myeloid-specific leukocyte integrin gene CD11d during macrophage foam cell differentiation and exposure to lipoproteins. *Int J Mol Med.* 2002;10(6):721–7.
223. Larsen SK, Gao Y, Basse PH. NK Cells in the Tumor Microenvironment. *Crit Rev Oncogenesis.* 2014;19(1–2):91–105.
224. Melaiu O, Lucarini V, Cifaldi L, Fruci D. Influence of the Tumor Microenvironment on NK Cell Function in Solid Tumors. *Front Immunol.* 2020;10:3038.
225. Ben-Shmuel A, Biber G, Barda-Saad M. Unleashing Natural Killer Cells in the Tumor Microenvironment—The Next Generation of Immunotherapy? *Front Immunol.* 2020;11:275.
226. Zhang Q, Bi J, Zheng X, Chen Y, Wang H, Wu W, et al. Blockade of the checkpoint receptor TIGIT prevents NK cell exhaustion and elicits potent anti-tumor immunity. *Nat Immunol.* 2018;19(7):723–32.
227. Bi J, Tian Z. NK Cell Exhaustion. *Front Immunol.* 2017;8:760.
228. Yang Q, Goding S, Hagensars M, Carlos T, Albertsson P, Kuppen P, et al. Morphological appearance, content of extracellular matrix and vascular density of lung metastases predicts permissiveness to infiltration by adoptively transferred natural killer and T cells. *Cancer Immunol Immunother.* 2006;55(6):699–707.
229. Glas R, Franksson L, Une C, Eloranta M-L, Öhlén C, Örn A, et al. Recruitment and Activation of Natural Killer (Nk) Cells in Vivo Determined by the Target Cell Phenotype An Adaptive Component of Nk Cell–Mediated Responses. *J Exp Medicine.* 2000;191(1):129–38.
230. Lanier LL. NK CELL RECEPTORS. *Annu Rev Immunol.* 1998;16(1):359–93.
231. Ai W, Li H, Song N, Li L, Chen H. Optimal Method to Stimulate Cytokine Production and Its Use in Immunotoxicity Assessment. *Int J Environ Res Pu.* 2013;10(9):3834–42.
232. Dooley J, Pasciuto E, Lagou V, Lampi Y, Dresselaers T, Himmelreich U, et al. NOD mice, susceptible to pancreatic autoimmunity, demonstrate delayed growth of pancreatic cancer. *Oncotarget.* 2014;5(0):80167–74.
233. Huntington ND, Vosshenrich CAJ, Santo JPD. Developmental pathways that generate natural-killer-cell diversity in mice and humans. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(9):703–14.

234. Miyazaki Y, Vieira-de-Abreu A, Harris ES, Shah AM, Weyrich AS, Castro-Faria-Neto HC, et al. Integrin α D β 2 (CD11d/CD18) Is Expressed by Human Circulating and Tissue Myeloid Leukocytes and Mediates Inflammatory Signaling. *Plos One*. 2014;9(11):e112770.
235. Fu B, Wang F, Sun R, Ling B, Tian Z, Wei H. CD11b and CD27 reflect distinct population and functional specialization in human natural killer cells. *Immunology*. 2011;133(3):350–9.
236. Fu B, Tian Z, Wei H. Subsets of human natural killer cells and their regulatory effects. *Immunology*. 2014;141(4):483–9.